

**Identifikation und Charakterisierung
von Ziel-mRNS des circadianen RNS-Bindeproteins CHLAMY 1
aus *Chlamydomonas reinhardtii***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Harald Waltenberger

August 2002

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. Maria Mittag
- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Wolfhart Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2002

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

Mittag, M., Waltenberger, H. (1997). *In vitro* mutagenesis of binding site elements for the clock-controlled proteins CCTR and Chlamy 1. Biol. Chem. 378, 1167-1170

Waltenberger, H., Schneid, C., Grosch, J.O., Bareiss, A., Mittag, M. (2001). Identification of target mRNAs for the clock controlled RNA-binding protein Chlamy 1 from *C. reinhardtii*. Mol. Genet. Genomics 265, 180-188

1	EINLEITUNG	1
1.1	Circadiane Rhythmik	1
1.2	Wie funktioniert die circadiane Uhr ?	3
1.3	<i>Gonyaulax polyedra</i> als circadianes System	7
1.4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als circadianes System	9
1.5	Ziele der Arbeit	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Chemikalien	14
2.1.3	Enzyme	14
2.1.4	„Kits“	15
2.1.5	Bakterienstämme	16
2.1.6	Algen-Stämme	16
2.1.7	Vektoren	17
2.1.8	Rekombinante Plasmide	17
2.1.9	Synthetische Oligonukleotide	20
2.1.10	Molekulargewicht-Standards	22
2.1.11	Kulturmedien	23
2.1.11.1	Medien für Bakterien und Phagen	23
2.1.11.2	Medien zur Anzucht von <i>C. reinhardtii</i>	23
2.1.12	Puffer und Lösungen	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	Kultivierung von <i>G. polyedra</i>	26
2.2.2	Kultivierung von <i>C. reinhardtii</i>	27
2.2.2.1	Stämme/Anzuchtmedien	27

2.2.2.2	Kulturbedingungen	27
2.2.2.3	Bestimmung der Zelldichte einer <i>C. reinhardtii</i> -Kultur	27
2.2.2.4	Ernte	28
2.2.3	Rohextrakte aus <i>G. polyedra</i>	28
2.2.4	Rohextrakte aus <i>C. reinhardtii</i>	28
2.2.4.1	Zellaufschluß für „mobility shift“-und „UV-crosslink“-Experimente	28
2.2.4.2	Zellaufschluß für Argininosuccinat-Lyase (ASL) Enzymtest	29
2.2.5	Molekularbiologische Standard-Methoden	29
2.2.5.1	Plasmidpreparation im kleinen Maßstab aus <i>E. coli</i>	29
2.2.5.2	Plasmidpreparation im großen Maßstab aus <i>E. coli</i>	30
2.2.5.3	Phenol/Chloroform-Extraktion	30
2.2.5.4	Ethanolische Fällung von DNS	30
2.2.5.5	Ethanolische Fällung von RNS	31
2.2.5.6	Quantifizierung von Nukleinsäuren	31
2.2.5.7	Restriktionsverdau von DNS	32
2.2.5.7.1	Analytischer Restriktionsverdau	32
2.2.5.7.2	Präparativer Restriktionsverdau	32
2.2.5.8	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	32
2.2.5.9	Transformation von <i>E. coli</i> XL1-Blue	33
2.2.5.10	Transformation von <i>E. coli</i> NM522 <i>mutS</i>	33
2.2.5.11	Blau/weiß-Selektion auf rekombinante Plasmide	33
2.2.5.12	DNS-Sequenzierung	34
2.2.5.13	Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung	34
2.2.6	Elektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen	34
2.2.6.1	DNS-Gelelektrophorese im Agarosegel	34
2.2.6.2	Denaturierende DNS-Gelelektrophorese im alkalischen Agarosegel	35
2.2.6.3	DNS-Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel	35
2.2.6.4	RNS-Gelelektrophorese im Agarosegel	36
2.2.6.5	Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran	37
2.2.6.6	Methylenblau-Färbung von membrangebundener RNS	38

2.2.6.7	Denaturierende Gelelektrophorese für die Auftrennung von RNS-Transkripten	38
2.2.6.8	Gelelektrophorese für die Auftrennung von nativen RNS/Proteinkomplexen	38
2.2.6.9	Denaturierende Proteingel-Elektrophorese (Laemmli, 1970)	39
2.2.7	Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren aus <i>C. reinhardtii</i>	40
2.2.7.1	Isolierung von genomischer DNS	40
2.2.7.2	Isolierung von RNS	41
2.2.7.3	Isolierung von poly(A) ⁺ RNS	42
2.2.7.4	Radioaktive Markierung von cDNS-Sonden	43
2.2.7.5	Abtrennung nicht-eingebauter Nukleotide	43
2.2.7.6	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	44
2.2.7.7	Hybridisierung mit cDNS-Sonden	44
2.2.7.8	Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde OMM40	45
2.2.8	Transformation von <i>C. reinhardtii</i>	46
2.2.8.1	Gewinnung von Autolysin (modifiziert nach Harris, 1989)	46
2.2.8.2	Transformation (nach Kindle, 1990)	47
2.2.9	<i>in vitro</i> -Mutagenese von DNS	47
2.2.10	Herstellung und Sichtung einer cDNS-Bank aus <i>C. reinhardtii</i>	50
2.2.10.1	Synthese der cDNS-Bank	50
2.2.10.2	Sichtung der cDNS-Bank durch „plaque“-Hybridisierung	53
2.2.10.3	<i>in vivo</i> -Exzision des pBluescript Phagemids	54
2.2.10.4	Freisetzung der Phagen-DNS durch Proteolyse	54
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
2.2.11.1	Design der Oligonukleotide	55
2.2.11.2	Amplifikation von Matrizen mit starker Sekundärstruktur	56
2.2.11.3	Amplifikation mit Heißstart-Polymerasen	56
2.2.11.4	„touchdown“-PCR	57
2.2.11.5	³² P-markierte PCR-Produkte	57
2.2.11.6	Amplifikation von RNS-Matrizen mittels RT-PCR	57
2.2.11.6.1	Reverse Transkription	57

2.2.11.6.2 RT-PCR mit dem „Titan™ One Tube RT-PCR System“ (Boehringer)	58
2.2.12 Klonierung von PCR-Fragmenten	58
2.2.12.1 Reinigung des Amplifikats	58
2.2.12.2 Glätten der DNS-Enden mit dem Klenow-Enzym	58
2.2.12.3 Dephosphorylierung von DNS-Enden	59
2.2.12.4 Elution von PCR-Fragmenten aus einem Agarosegel	59
2.2.12.5 Ligation von DNS in einen linearisierten Vektor	59
2.2.13 Untersuchungen zu RNS/Proteinwechselwirkungen	60
2.2.13.1 RNS-Synthese	60
2.2.13.1.1 Synthese größerer Mengen unmarkierter RNS	60
2.2.13.1.2 Synthese des ³² P-markierten RNS-Transkripts	61
2.2.13.1.3 Aufreinigung des ³² P-markierten RNS-Transkripts	61
2.2.13.1.4 Das „mobility shift“-Experiment (Mittag <i>et al.</i> , 1994)	62
2.2.13.1.5 Das „UV-crosslink“-Experiment (Waltenberger <i>et al.</i> , 2001)	62
2.2.14 Autoradiographie und Quantifizierung radioaktiver Banden	63
2.2.15 Statistische Auswertung	63
2.2.15.1 Auswertung der semiquantitativen RT-PCR	63
2.2.15.2 Berechnung des Standardfehlers (S _A)	64
2.2.16 ASL-Enzymtest (modifiziert nach: Loppes <i>et al.</i> , 1972; van Pilsum <i>et al.</i> , 1955)	64
3 ERGEBNISSE	66
3.1 Charakterisierung der Bindestelle für CHLAMY 1 und den CCTR	66
3.1.1 <i>In vitro</i> -Mutagenese des <i>lbp</i> 3'-UTRs (Mittag und Waltenberger, 1997)	66
3.1.2 Charakterisierung der mutierten Sequenzen im „mobility shift“-Experiment	70
3.2 Synthese einer cDNS-Bank aus <i>C. reinhardtii</i>	72
3.2.1 cDNS-Synthese	73
3.2.2 Verpackung und Amplifikation der cDNS-Bank	75

3.2.3	Qualität der cDNS-Bank	76
3.3	Sichtung der cDNS-Bank	77
3.3.1	Sichtung der cDNS-Bank durch Plaque-Hybridisierung	78
3.3.2	Sichtung der cDNS-Bank durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	79
3.3.2.1	Amplifikation des 3'-UTRs	80
3.3.2.2	Amplifikation der 5' der 3'-UTRs gelegenen Genbereiche	85
3.3.2.3	Analyse der Sequenzdaten nach Aufnahme des <i>C. reinhardtii</i> -„EST Projekts“	88
3.4	Sichtung von „GenBank“ beim NCBI	89
3.5	Klonierung der 3'-UTRs mit „UG“-Repetition	90
3.6	Untersuchungen zur Bindung von CHLAMY 1 an die 3'-UTRs der acht mRNS	94
3.6.1	Untersuchung der Bindung im „mobility shift“-Experiment	95
3.6.2	Charakterisierung der RNS-Bindeproteine im „UV-crosslink“-Experiment	99
3.7	Die Bindeaktivität von CHLAMY 1 zu den verschiedenen 3'-UTRs variiert stark	102
3.8	Untersuchungen zur circadianen Regulation der Argininosuccinat-Lyase in <i>C. reinhardtii</i>	106
3.8.1	Circadiane Kontrolle der ASL Enzym-Aktivität	108
3.8.2	Circadiane Regulation der <i>arg7</i> -mRNS	111
3.8.2.1	Semiquantitative RT-PCR	111
3.8.2.1.1	Etablierung der PCR	112
3.8.2.1.2	Quantifizierung der RNS	116
3.8.2.2	Quantifizierung durch „Northern“-Hybridisierung	119
3.9	Regulation der ASL in einem <i>arg7</i>(-UG)-transformierten Stamm	125
3.9.1	Struktur des <i>arg7</i> -Gens in pJD67	125

3.9.2	Mutagenese der UG-Repetition im 3'-UTR von <i>arg7</i>	127
3.9.3	Transformation von <i>arg7_{UG}</i> in ASL defiziente <i>C. reinhardtii</i>	135
4	DISKUSSION	139
4.1	Charakterisierung des RNS-Bindemotivs für CHLAMY 1 und den CCTR durch <i>in vitro</i> -Mutagenese	139
4.2	Sichtung einer cDNS-Bank und von „GenBank“ (NCBI) nach <i>C. reinhardtii</i> -Genen mit der „UG“-Repetition	142
4.3	Interaktion zwischen CHLAMY 1 und den mRNS mit „UG“-Repetition im 3'-UTR	145
4.4	CHLAMY 1: ein wichtiger circadianer Regulator im Stoffwechsel von <i>C. reinhardtii</i> ?	147
4.5	Circadiane Regulation der ASL-Aktivität	151
4.6	Expression der <i>arg7</i> -mRNS in <i>C. reinhardtii</i>	153
4.7	Bedeutung der „UG“-Repetition im 3'-UTR für die circadiane Regulation der ASL-Aktivität <i>in vivo</i>	156
4.8	Offene Fragen	159
5	ZUSAMMENFASSUNG	161
6	ANHANG	163
6.1	Sequenzen der klonierten cDNS-Fragmente	163
7	LITERATURVERZEICHNIS	166
8	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	178

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
CCTR	circadian controlled translational regulator
cDNS	DNS-Kopie einer RNS
cfu	„colony forming units“, Kolonie-bildende Einheiten (Bakterien oder Hefen)
CTP	Cytosintriphosphat
DD	Dauerdunkel
ddH ₂ O	zweifach über Ionenaustauscher entsalztes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemo luminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	„expressed sequence tag“
EtOH	Ethanol
g	Gramm, Erdbeschleunigung
gDNS	genomische Desoxyribonukleinsäure
GTC	Guanidinthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
ICL	Isocitrat-Lyase

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kB	Kilo-Basen(-Paare)
kDa	Kilo-Dalton
LD	Licht-Dunkel
LL	Dauerschwachlicht
MCS	„multiple cloning site“, multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
mt	„mating type“, Paarungstyp
NaAc	Natriumacetat
NADPH/H ⁺	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
OD	optische Dichte bei 1 cm Schichtdicke
ORF	„open reading frame“, offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pfu	„plaque forming units“, Phagenplaque-bildende Einheit
POR	NADPH:Protochlorophyllidoxidoreduktase
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	„untranslated region“ untranslatierter Bereich der RNS
V	Volt
Vol	Volumen

w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Circadiane Rhythmik

Die Erde umkreist die Sonne auf einer elipsoiden Bahn. Ein vollständiger Umlauf dauert 365 Tage, wobei sich die Erde dabei binnen 24 h einmal von West nach Ost um ihre eigene Achse dreht. Jeder Punkt der Erdoberfläche liegt innerhalb dieser 24 h einmal auf der sonnenzugewandten Seite und einmal auf der sonnenabgewandten Seite. Eine Ausnahme bilden hier nur die Polkappen, wo in Abhängigkeit von der jahreszeitlichen Stellung der Erdachse zur Sonne jedes Jahr für mehrere Monate Dauerlicht bzw. Dauerdunkel herrscht. Dem Rhythmus von Licht und Dunkel ist die gesamte belebte Natur unterworfen. Lediglich Organismen, die in Höhlen leben, und Bewohner der Tiefsee können sich ihm entziehen. In der Tierwelt drückt sich der Tag/Nachtwechsel beispielsweise im Übergang zwischen Ruhe- und Aktivitätsphase aus, wobei es sowohl tagaktive als auch nachtaktive Tiere gibt. Eine besondere Rolle spielt der Tag/Nachtwechsel für die Pflanzen. Sie schalten ihren Stoffwechsel von der Verbrennung gespeicherter Zucker im Dunkeln mit Einsetzen des Tageslichts auf die Neusynthese von Zuckern (die sogenannte Photosynthese) um. Lange Zeit war man der Auffassung, daß lediglich mit dem Einsetzen von Licht bzw. Dunkel der Übergang in die jeweils andere Phase initiiert wird. Erst die überraschende Entdeckung eines französischen Wissenschaftlers warf einen völlig neuen Aspekt auf (De Mairan, 1729). De Mairan beobachtete das morgendliche Heben und abendliche Senken der Blätter einer Pflanze. Diese tagesrhythmische Bewegung setzte sich auch dann fort, wenn er die Pflanze in eine Dunkelkammer stellte, in der sie nicht mehr länger dem Sonnenlicht ausgesetzt war. Die Blattbewegung stellte offenbar nicht nur eine einfache Reaktion auf Sonnenlicht oder Dunkelheit dar, vielmehr mußte die Pflanze eine Fähigkeit zur Zeitmessung haben, eine sogenannte „innere Uhr“, die das Heben und Senken der Blätter kontrollierte. Solche endogen gesteuerten tageszeitlichen Rhythmen werden als „circadian“ (von lateinisch „circa“ = ungefähr und „dies“ = Tag) bezeichnet. Charakteristisch für einen circadianen

Rhythmus ist neben der Schwingungsdauer von etwa 24 Stunden, unter konstanten Bedingungen von Licht und Temperatur (nur unter Laborbedingungen), vor allem auch sein endogener Ursprung. In der Umwelt wirken jedoch Faktoren wie z. B. Licht und Temperatur als Zeitgeber, die den endogenen Rhythmus mit dem Rhythmus der Umwelt synchronisieren. Der stärkste Zeitgeber ist das Licht. Schwächere Zeitgeber sind Temperatur und Nahrungsangebot, bei höheren Tieren kann aber auch die Möglichkeit zur Bewegung (Lokomotion) oder auch die soziale Interaktion als Zeitgeber fungieren (Wollnik, 1989). Die Synchronisation führt dazu, daß die Periodenlänge τ des endogenen Oszillators angepaßt wird, wenn sie nicht exakt der der Umwelt entspricht. Wird ein Organismus zum Beispiel mit einem 24-stündigen Licht/Dunkelzyklus (LD) zunächst synchronisiert und dann konstantem Licht ausgesetzt (LL), so schwingt sein Oszillator mit der ihm eigenen Periodenlänge und nicht mit der exogen vorgegebenen Periodenlänge weiter. Dabei ist jedoch eine Dämpfung der Schwingungsamplitude zu beobachten d. h. ein Nachlassen der circadianen Phänomene. In der freien Natur findet i. d. R. eine permanente Synchronisation statt, da biologische Oszillatoren nicht immer mit einer Periodenlänge von exakt 24 h schwingen (Vitaterna *et al.*, 2001). Eine Korrektur der Periodenlänge kann jedoch nur bis zu einem gewissen Grad erfolgen, dem sogenannten Mitnahmebereich. Beim Überschreiten dieser Grenze kann der circadiane Oszillator nicht mehr folgen und der Organismus wird arrhythmisch. Während circadiane Systeme ihre Periodenlänge nur innerhalb der engen Grenzen des Mitnahmebereichs verändern, können sie sich jedoch sehr gut mit phasenverschobenen Rhythmen der gleichen Periodenlänge synchronisieren. Die Veränderung bzw. Verschiebung der Schwingungsphase wird auch als „phase shift“ bezeichnet. So kann z. B. durch vorzeitiges Licht am Ende der Dunkelphase die Uhr vorgestellt werden („phase advance“). Entsprechend kann durch einen verzögerten Beginn der Dunkelphase die Uhr zurückgestellt werden („phase delay“). Eine solche Phasenverschiebung benötigt jedoch, auch in Abhängigkeit von der Phasendifferenz, gegebenenfalls mehrere Zyklen bis die vollständige Synchronisation wieder erreicht ist. Das Ausmaß der Phasenverschiebung, das ein

exogener Stimulus in jeder Phase des circadianen Zyklus bewirkt, kann in der sogenannten Phasen-Response-Kurve (PRC) dargestellt werden.

Ein weiteres Charakteristikum circadianer Rhythmen ist das Phänomen der Temperaturkompensation. Während einfache biochemische Reaktionen bei einer Erhöhung der Temperatur um 10°C mit nahezu doppelter Geschwindigkeit ablaufen ($Q_{10} \sim 2$), bleibt die Schwingungsdauer eines circadianen Oszillators unter physiologischen Bedingungen nahezu unabhängig von der Temperatur. Der Q_{10} -Wert liegt hier bei 0,8 – 1,3 (Pittendrigh & Caldarola, 1973). Diese Fähigkeit sich an Veränderungen in der Natur anzupassen ist essentiell, denn eine Uhr, die bei Erwärmung schneller und bei Abkühlung langsamer laufen würde, wäre nicht brauchbar.

Circadiane Rhythmik findet sich bereits bei Prokaryoten (Kondo *et al.*, 1993) und ist nahezu allgegenwärtig bei Pflanzen, Pilzen und Tieren (Sogin, 1994). Die weite Verbreitung der inneren Uhr in der belebten Welt unterstreicht ihre Bedeutung. Durch sie ist es einem Organismus erst möglich, Veränderungen, die mit dem Tag/Nachtwechsel verbunden sind wahrzunehmen und sich an diese anzupassen. Darüber hinaus sorgt die Uhr auch endogen für eine temporäre Organisation, so daß interne Veränderungen koordiniert ablaufen. Die Synchronität eines Organismus zwischen externer und interner Umwelt ist essentiell für sein Wohlbefinden und sein Überleben. Würde zum Beispiel ein nachtaktiver Nager seinen Unterschlupf am hellichten Tag verlassen, wäre er eine leichte Beute für tagaktive Räuber. Ebenso könnte eine Pflanze, die ihren Stoffwechsel nicht rechtzeitig auf Photosynthese umstellt, das erste Tageslicht noch nicht effektiv zum Aufbau von Kohlehydraten nutzen.

1.2 Wie funktioniert die circadiane Uhr ?

Die Identifikation der ersten sogenannten Uhrenmutanten *period* bei *Drosophila melanogaster* bzw. *frequency* bei *Neurospora crassa* nach Einsatz mutagener Substanzen bewiesen die genetische Grundlage der inneren Uhr (Konopka & Benzer, 1971; Feldman & Hoyle, 1973). Mittlerweile wurden auch in weiteren

Organismen eine Vielzahl an Genen entdeckt, die direkt oder indirekt mit dem circadianen Oszillator in Verbindung stehen. Alle bekannten circadianen Oszillatoren basieren auf einem gemeinsamen Prinzip, daß eine Rückkopplungsschleife bei der Expression von Genen darstellt (Dunlap, 1999). Abb. 1 entwirft ein allgemeines Modell für ein circadianes System. In seinem Zentrum steht der Oszillator als Generator einer autonomen Schwingung. Die einzelnen Komponenten des Oszillators können sich bei den Organismen stark voneinander unterscheiden. Die Rückkopplung besteht darin, daß positive Elemente die Expression eines Uhrengens fördern dessen Genprodukt wiederum einen negativen Effekt auf seine eigene Expression ausübt. Sowohl positive als auch negative Elemente können sich aus mehreren Faktoren zusammensetzen. Die Interaktion dieser Elemente verläuft oft über Zwischenschritte unter Beteiligung weiterer Faktoren. Bei *Arabidopsis* bilden vermutlich die drei Faktoren *TOC1* („*timing of CAB expression 1*“) und *CCA1/LHY* („*circadian clock associated 1*“/ „*late elongated hypocotyl*“) die Elemente einer solchen Rückkopplungsschleife. Jüngst veröffentlichte Untersuchungen postulieren ein Oszillatormodell, in dem die zwei Transkriptionsfaktoren *CCA1* und *LHY* direkt an den *TOC1*-Promotor binden und so dessen Transkription reprimieren (Young & Kay, 2001). *TOC1* selbst wirkt als positives Element, indem es die Transkription von *CCA1* und *LHY* durch einen noch unbekannten Mechanismus fördert.

Ein entscheidender Bestandteil jedes circadianen Systems ist die Aufnahme und Weiterleitung von Signalen aus der Umwelt zum Oszillator. So ist eine Synchronisation mit der Umwelt möglich. Der stärkste und bestcharakterisierteste Zeitgeber ist das Licht. Es führt vom Cyanobakterium über die Pflanze bis zum Säuger zu einer schnellen Synchronisation mit der Umwelt. Tiere besitzen häufig mehrere uhrenspezifische Photorezeptoren. Bei *Drosophila* ist die Lichtperzeption über das Cryptochrom, das sich in den Schrittmacherzellen selbst befindet, am besten untersucht. Darüber hinaus wurden bislang noch zwei weitere Eingänge für Lichtreize in den Oszillator, nämlich das Komplexauge bzw. eine extraokulare Photorezeption, beschrieben (Helfrich-Forster *et al.*, 2001). Bei den Säugern übernehmen die Opsine im Auge diese Funktion, Untersuchungen in der Maus sprechen aber auch für eine funktionell redundante Rolle der Cryptochrome

(Selby *et al.*, 2000). Neben ihrer Rolle als Photorezeptor sind die Cryptochrome bei der Maus wiederum auch Teil des Oszillators selbst (Van der Horst *et al.*, 1999). Bei Pflanzen erfolgt die Synchronisation über phytochrom- und cryptochromvermittelte Lichtwahrnehmung. Interessanterweise wird bei *Arabidopsis* das Cryptochrom 1 wiederum rhythmisch exprimiert (McClung, 2001), sodaß die Uhr gegebenenfalls ihre eigene Empfindlichkeit gegenüber Lichtstimuli regulieren kann.

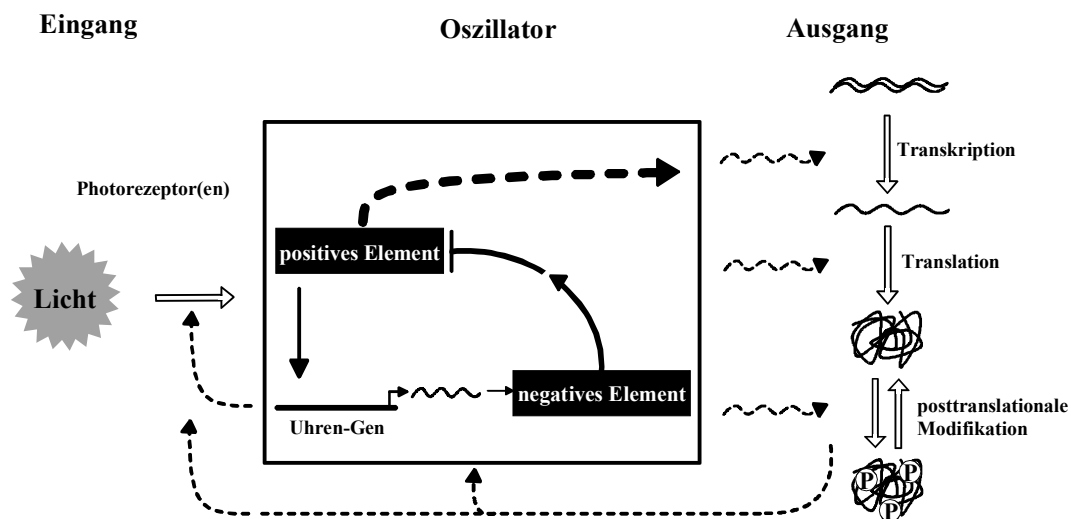


Abb. 1: Vereinfachtes Modell eines circadianen Systems

Ein circadianes System kann sich bereits auf der Ebene einer einzelnen Zelle entwickeln (Dunlap, 1999). In seinem Zentrum steht der Oszillator, der bei allen bekannten Systemen eine Rückkopplungsschleife aus aktivierenden und reprimierenden Elementen darstellt. Synchronisation mit der Umwelt wird in erster Linie durch Lichtperzeption ermöglicht. Rückkopplungsschleifen vom Oszillator auf den Eingang und/oder vom Ausgang auf den Oszillator bzw. den Eingang sind gegebenenfalls für die perfekte Anpassung des circadianen Systems an die Umwelt nötig (Dunlap, 1999). Manifestiert werden Rhythmen über die Rate von Transkription, Translation und/oder durch posttranslationale Modifikationen.

Der Ausgang des Oszillators ist schließlich für die Vermittlung der endogenen Schwingung zur Ausprägung eines circadianen Verhaltens verantwortlich. Das am besten untersuchte Prinzip ist das der transkriptionalen Regulation. Anhand von Analysen differentieller Genexpression zu unterschiedlichen circadianen Zeiten wurden im Tier- und Pflanzenreich bereits eine Vielzahl Gene identifiziert, die circadian transkribiert werden. So schätzt man beispielsweise, daß in *Arabidopsis* zwischen 5 und 6 % aller Gene rhythmisch exprimiert werden. Bei einer Gesamtzahl von etwa 25.000 Genen wären das immerhin bis zu 1500 Gene

(Harmer *et al.*, 2000). Noch stärker ist dieses Prinzip bei *Synechococcus* umgesetzt, wo die Uhr global die Genexpression reguliert (Liu *et al.*, 1995). Eine weitere Form der circadianen Kontrolle kann über die Regulation der Translation erfolgen. Es konnte gezeigt werden, daß in dem Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* das circadiane Leuchten u. a. über die Translation des Luciferinbindepoteins (LBP) gesteuert wird (Mittag *et al.*, 1994). Schließlich kann die Vermittlung circadianer Rhythmik auch über posttranslationale Modifikationen erfolgen. Intensiv studiert wurden in diesem Zusammenhang die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen, die schon bei den Oszillatorelementen selbst eine entscheidende Rolle spielen (FRQ, PER und TIM). So findet man circadian regulierte Phosphorylierung zur Aktivitätssteuerung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPc) im Ausgang des Systems bei der Crassulacea *Kalanchoë* (Wilkins, 1992). Bei *Drosophila* beeinträchtigt ein Defekt in der Protein Kinase A die Manifestierung rhythmischer Aktivitäten (Majercak *et al.*, 1997). Die Vermittlung der Rhythmik muß jedoch nicht notwendigerweise nur über einen der aufgezeigten Wege erfolgen: die Genprodukte FRQ und TIM sind andererseits gute Beispiele für eine komplexe Regulation. Ihre Gene werden transkriptional reguliert, die Translation wird differentiell initiiert und die Proteine werden phosphoryliert (Dunlap, 1999).

Circadiane Rhythmen können auf der Ebene einzelner Zellen generiert werden. Somit stellt sich zwangsläufig die Frage nach der Regulation der Rhythmik in vielzelligen Organismen. Während bei *Arabidopsis* und vermutlich bei allen höheren Pflanzen die Genexpression durch autonome circadiane Uhren kontrolliert wird (Thain *et al.*, 2000), finden sich bei den Tieren zentrale Schrittmacher. Bei Säugern übernimmt diese Funktion eine Region an der Basis des hinteren Hypothalamus, der sogenannte Suprachiasmatische Nucleus (SCN) (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972), und bei den Insekten hauptsächlich die lateral-ventralen Neuronen (LNvs) (Renn *et al.*, 1999).

1.3 *Gonyaulax polyedra* als circadianes System

In dem einzelligen marinen Dinoflagellaten *G. polyedra* sind eine Vielzahl von zellulären Prozessen unter circadianer Kontrolle, so z. B. Photosynthese, Zellaggregation und Biolumineszenz. Darüber hinaus sind eine Reihe von Enzymen bekannt, deren Menge bzw. Aktivität von der inneren Uhr reguliert wird. Hierzu zählen z. B. die Nitrat-Reduktase (Ramalho *et al.*, 1995), die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (Marcovic *et al.*, 1996) und die Tyrosin-Aminotransferase (Groß *et al.*, 1994).

Intensiv untersucht ist der Biolumineszenzrhythmus von *G. polyedra*, der sich in der freien Natur als nächtliches Meeresleuchten beobachten läßt. Das gesamte Biolumineszenzsystem von *G. polyedra* steht unter circadianer Kontrolle, wobei das Maximum in der Nachtphase erreicht wird (Morse *et al.*, 1990). Die Komponenten des Systems sind in kleinen Organellen lokalisiert, die als Szintillonen bezeichnet werden. Bestandteile des Systems sind das Enzym Luziferase (LCF), sein Substrat Luziferin und das Luziferin-Bindeprotein (LBP), welches das Substrat bindet. Die Proteinmengen von LCF und LBP sind circadian reguliert und erreichen ihr Maximum in der Nacht (Dunlap & Hastings, 1981; Johnson *et al.*, 1984; Morse *et al.*, 1989a). Damit korreliert eine Zunahme der Szintillonen, deren Zahl von 40 am Tag auf bis zu 400 in der Nacht anwachsen kann (Fritz *et al.*, 1990). Untersuchungen zur mRNA-Menge zeigten dagegen, daß sowohl die LCF-mRNA als auch die LBP-mRNA keinen tag/nachtabhängigen Schwankungen unterworfen sind, sondern ein konstant hohes Niveau haben (Morse *et al.*, 1989b; Mittag *et al.*, 1998). Durch „pulse chase“ Markierungen zu unterschiedlichen circadianen Zeiten stellte sich heraus, daß die Neusynthese des LBP gegen Ende der Tagphase bis in die frühe Nachtphase stattfindet. Daraus wurde geschlossen, daß die circadiane Regulation des LBP auf translationaler Ebene erfolgt (Morse *et al.*, 1990). Durch „mobility shift“-Experimente konnte ein Faktor detektiert werden, der spezifisch an eine Sequenz im 3'-UTR der *lbp*-mRNA bindet und dessen Bindeaktivität circadian reguliert wird (Mittag *et al.*, 1994). Dieser Faktor wurde aufgrund seiner Eigenschaften als CCTR („circadian-controlled translational regulator“) bezeichnet. Die Menge an gebundenem CCTR

zeigt eine Rhythmik, die auch dann fortbesteht, wenn die Zellen unter konstantem Schwachlicht wachsen. Zu Beginn der Nachtphase nimmt die CCTR-Bindeaktivität ab, während gleichzeitig die LBP-Synthese startet, umgekehrt nimmt die Bindeaktivität des CCTR gegen Ende der Nachtphase wieder zu, wenn die LBP-Synthese stoppt. Offensichtlich fungiert der CCTR als ein Repressor, der die Translation der *lbp*-mRNS während der Tagphase verhindert.

Das Bindemotiv im 3'-UTR der *lbp*-mRNS konnte durch den Einsatz verkürzter RNS-Transkripte und spezifischer Kompetitoren im „mobility shift“-Experiment auf eine 22 Nukleotide lange Region eingegrenzt werden (Mittag *et al.*, 1994). Diese Sequenz enthält eingerahmt von flankierenden Sequenzen sieben „UG“-Wiederholungen mit einem „UUG“ an der fünften Position, und stellte somit ein völlig neues RNS-Bindemotiv dar. Mithilfe eines RNS-Faltprogramms (Abrahams *et al.*, 1990) wurde die Sekundärstruktur des *lbp* 3'-UTRs berechnet (Mittag *et al.*, 1994). Dabei zeigte sich, daß das Bindemotiv Teil einer Haarnadel/Schleifenstruktur ist. Hybridisierungsexperimente mit Oligonukleotiden, die komplementär zu Abschnitten dieser Region waren, zeigten, daß die einzelsträngige Schleifenregion, die den Großteil der „UG“-Wiederholung umfaßt, für eine Bindung des CCTR absolut notwendig ist (Mittag *et al.*, 1994). Die Bindung des CCTR ist demnach nicht nur von der Sequenz des RNS-Motivs, sondern auch von seiner Sekundärstruktur abhängig.

Die circadiane Translation der *lbp*-mRNS wird jedoch nicht nur von der 22 Nukleotide langen Region im 3'-UTR beeinflusst. *In vitro*-Translationsexperimente mit der vollständigen *lbp*-RNS resultierten stets in zwei unterschiedlich großen Proteinen mit einer ungefähren Größe von 72 bzw. 75 kDa (Mittag *et al.*, 1997). Untersuchungen zur *in vivo*-Situation bestätigten dieses Ergebnis und zeigten darüber hinaus, daß das etwa 75 kDa große Protein einen klaren Rhythmus mit einem Maximum in der Nachtphase zeigte (Morse *et al.*, 1989b). Die Menge des etwa 72 kDa großen Proteins ließ sich nicht exakt bestimmen, da sie entweder konstant blieb oder in der Nachtphase abnahm. Gegebenenfalls fand eine differentielle Initiation der LBP-Synthese statt, die zudem circadian kontrolliert war.

Es stellte sich die Frage, ob die Bindung des CCTR an den 3'-UTR während der Nachtphase einen Einfluß auf die circadiane Translation des ca. 75 kDa großen Proteins haben könnte. Eine Vorstellung über den Mechanismus der Interaktion zwischen dem CCTR, der am 3'-UTR der mRNA bindet, und dem Start der Translation am 5'-UTR entwickelte sich aus den Entdeckungen von Tarun & Sachs (1996). Sie konnten zeigen, daß in *S. cerevisiae* das Poly(A)-Bindepotein (Pab1p) eine starke Interaktion mit dem Initiationsfaktor eIF4G zeigt, während es an den Poly(A)-Schwanz gebunden ist. Die mRNA bildet somit während der Initiation der Translation eine Schleife, bei der 5'-Ende und 3'-Ende aneinander liegen. Für die *lbp*-mRNA könnte dies bedeuten, daß der CCTR, der am Tag an den 3'-UTR bindet, dadurch in unmittelbarer Nähe des Initiationskomplexes lokalisiert wäre und somit einen direkten Einfluß auf die differentielle Translation von LBP ausüben könnte.

Der gesamte Mechanismus der circadianen Regulation der Biolumineszenz in *G. polyedra* ist bisher erst in Ansätzen untersucht. Daraus ergeben sich jedoch eine Vielzahl an genetischen und biochemischen Studien, die zur weiteren Aufklärung des Systems nötig sind.

1.4 *Chlamydomonas reinhardtii* als circadianes System

Die einzellige eukaryontische Grünalge *C. reinhardtii* stellt einen genetischen Modellorganismus dar, bei dem eine Vielzahl physiologischer und verhaltensspezifischer Phänomene einen circadianen Rhythmus zeigen; hierzu zählen Phototaxis, Chemotaxis, die Zelladhäsion an Glas, der Zellteilungszyklus (Referenzen bei Johnson *et al.*, 1992), der extrazellulärer pH-Wert (Hoffmanns-Hohn *et al.*, 1984) und die Sensitivität gegenüber UV-Licht (Nikaido & Johnson, 2000). Darüber hinaus gibt es auch Mutanten, die eine veränderte Periode im Phototaxisrhythmus zeigen (Bruce, 1972; Bruce & Bruce, 1978). Besonders gut ist der circadiane Rhythmus der Genexpression bei *C. reinhardtii* untersucht. Mehrere nukleäre Gene zeigen circadiane Regulation auf Ebene der mRNA Menge (Jacobshagen *et al.*, 2001). Der mRNA-Rhythmus kann dabei sein

Maximum in der Tagphase erreichen, wie es z. B. für die mRNS der LHCB-Familie (Jacobshagen & Johnson, 1994; Jacobshagen *et al.*, 1996; Jacobshagen *et al.*, 2001) und für die mRNS der Carboanhydrase (*cah I*) (Fujiwara *et al.*, 1996) der Fall ist. Jedoch kann das Maximum auch in der Nachtphase liegen, wie es bei der mRNS für Cytochrom c (*cyt c*) gefunden wurde (Jacobshagen *et al.*, 2001). Eine besondere Form der Expression zeigt das Gen des ADP Ribosylierungsfaktors (*arf I*) (Memon *et al.*, 1995). In einem LD-Zyklus hat die mRNS ein Maximum zu Beginn der Lichtphase und ein zweites in der Dunkelphase. Da nach einem Wechsel in konstantes Dauerdunkel nur das zweite mRNS-Maximum bestehen bleibt, findet hier offenbar eine Kombination aus Lichtregulation und circadianer Regulation statt.

Neben den nukleären Genen werden auch eine Vielzahl der Gene des Chloroplasten circadian exprimiert. Hierzu zählen Gene aus den Photosystemen I und II (*psaA* und *psbA*), die β -Untereinheit der ATPase (*atpB*), der Verlängerungsfaktor Tu (*tufA*) und die chloroplastenkodierte ribosomale RNS (*rrn*) (Hwang *et al.*, 1996). Das Maximum der Transkription findet sich dabei jeweils zu Beginn der Lichtphase. Salvador *et al.* (1998) machten die interessante Entdeckung, daß die Chloroplasten-DNS offenbar eine circadiane Fluktuation ihres „Supercoiling“-Status aufweist. Da der Grad der DNS-Kondensation jedoch eng mit der Gesamttranskriptionsrate der Chloroplastengene korreliert, liegt der Schluß nahe, daß Änderungen in der Kondensation der DNS eine Rolle bei der Regulation der Genexpression im Chloroplasten spielen. Ob so auch die circadiane Expression vermittelt wird und ob hiervon gegebenenfalls alle Gene des Chloroplasten betroffen sind, ist jedoch ungewiss.

Erste Hinweise auf eine Rolle translationaler Regulation im circadianen Ausgang von *C. reinhardtii* erbrachten die Untersuchungen von Mittag (1996). Ausgangspunkt war die Frage, ob ein Faktor wie der CCTR aus *G. polyedra* während der Evolution konserviert worden war. Zur Suche nach einem analogen Faktor in *C. reinhardtii* wurde als Sonde der *lbp* 3'-UTR aus *G. polyedra*, an den der CCTR bindet, in „mobility shift“-Experimenten mit einem Rohextrakt aus *C. reinhardtii* getestet. Auf diese Weise konnten drei RNS-Bindeproteine,

CHLAMY 1, 2 und 3 aus *C. reinhardtii* detektiert werden, die spezifisch und circadian abhängig mit dem *lbp* 3'-UTR interagieren.

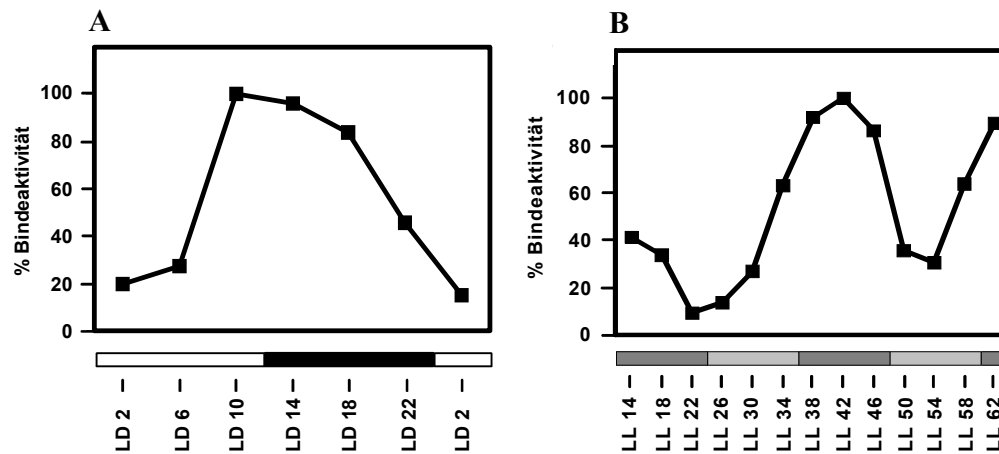


Abb. 2: Bindeaktivität von CHLAMY 1 in einem LD- und einem LL-Zyklus (nach Mittag, 1996)

Die relative Bindeaktivität von CHLAMY 1 zum *lbp* 3'-UTR wurde durch die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme von „mobility shift“-Experimenten mit Zellen eines LD- (A) und LL-Zyklus (B) ermittelt.

CHLAMY 1 zeigt maximale Bindung gegen Ende der Tagphase (Abb. 2) und verhält sich damit umgekehrt wie der CCTR, bei dem das Maximum zu Beginn der Tagphase liegt.

Die Bindung von CHLAMY 1 konnte durch das wt-*lbp* 3'-Ende kompetitiert werden, nicht jedoch durch ein mutiertes *lbp* 3'-Ende, dem die „U(U)G“-Wiederholung fehlte. Ebenso konnte die Bindung auch durch die Hybridisierung eines „antisense“-Oligonukleotids, das gegen die „U(U)G“-Wiederholung gerichtet war, verhindert werden. Diese Ergebnisse zeigten, daß CHLAMY 1 ebenso wie der CCTR spezifisch mit der „U(U)G“-Wiederholung des *lbp* 3'-UTR interagiert.

Die Bindestellen von CHLAMY 2 und 3 im *lbp* 3'-Ende konnten auf einen Bereich von 100 Nukleotiden eingengt werden. Sie binden beide nicht an die „U(U)G“-Wiederholung, jedoch gleichermaßen an einzelsträngige wie

doppelsträngige RNS. Damit zeigen sie ein gänzlich anderes Verhalten als CHLAMY 1 bzw. der CCTR. Ihre Funktion ist noch völlig ungeklärt.

Die Experimente legen die Vermutung nahe, daß ähnlich wie in *G. polyedra* auch in *C. reinhardtii* circadiane Regulation der Translation über die Bindung eines *trans*-Faktors an ein *cis*-Element auf der mRNA erfolgen könnte.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Proteine CCTR aus *G. polyedra* und CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* binden circadian abhängig an eine 22 Nukleotide lange Region im 3'-UTR der *lbp*-mRNA aus *G. polyedra*. Durch Mutagenese von Abschnitten dieser Region soll das Bindemotiv für CHLAMY 1 und den CCTR genauer charakterisiert werden. Mit Hilfe der so gewonnenen Informationen soll ein Oligonukleotid synthetisiert werden, das die zentrale Bindestelle von CHLAMY 1 umfaßt. Als Sonde eingesetzt, gilt es damit Gene aus *C. reinhardtii* zu suchen, deren mRNA potentielle Ziele für die Bindung von CHLAMY 1 darstellen. Aus mRNA von *C. reinhardtii* soll daraufhin eine cDNA-Genbank hergestellt werden, die mit der Oligonukleotid-Sonde nach entsprechenden mRNA-Moleküle durchsucht wird. Identifizierte mRNA-Moleküle werden auf eine spezifische Bindung von CHLAMY 1 untersucht, wobei etwaige Unterschiede in der Affinität von CHLAMY 1 zu den identifizierten mRNA-Molekülen bestimmt werden. Die so gewonnenen Daten könnten zur Beschreibung des optimalen Bindemotivs für CHLAMY 1 dienen. Bei einer oder mehrerer der identifizierten mRNA sollen Existenz und Modus einer circadianen Regulation des Proteins untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	-VARIOKLAV Typ 500 E, H+P (Labortechnik GmbH)
Kühlzentrifugen	-RC-5B (Sorvall) mit dem Rotor SS34 -Centrikon H-401 (Kontron Hermle) mit den Rotoren A8.24 und A6.14
Tischzentrifugen	-Zentrifuge 5415C (Eppendorf) -Universal-Zentrifuge (Hettich)
Minischüttler	-Vibrofix Vf1 Electronic (Bachofer) -MS2 Minishaker (IKA)
Vakuumkonzentrator	-Vacuum Concentrator (Bachofer) -Savant Speed Vac SC110 (Bachofer)
Geltrockner	-SDG 4050 (Bachofer)
Photometer	-UV/Vis-Spectrophotometer, Perkin-Elmer, Lambda2 -Diodenarray-Spektralphotometer HP 8451A (Hewlett Packard)
Thermocycler	-PTC-100 (MJ Research Inc.)
Elektrophorese-Apparaturen	horizontal: -Blue Marine 100 (Serva) -Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200 (Pharmacia) -Model B3 (AGS) vertikal: -Werkstatt Eigenbau, Gelgröße 15 x 13 cm

Lichtmeßgerät	-Li-189 Quantum Photometer (Lambda Instruments)
Phosphoimager	-Image plate reader Fujifilm Bas 1500 (Raytest)
Hybridisierungssofen	-30 SpecialHyb (Bachofer)

2.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biomol (Hamburg), BIO-RAD (München), Boehringer-La Roche (Mannheim), GIBCO/BRL (Karlsruhe), ICN (Eschwege), Merck AG (Darmstadt), PALL (Dreieich), peqlab (Erlangen), Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Schleicher & Schuell (Dassel), Sigma (Taufkirchen).

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Boehringer-La Roche (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und NEB (Frankfurt) bezogen.

- **RNase A** (0,9 U/μl; Roth, Karlsruhe): 100 mg wurden in 10 ml 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,8 gelöst und zur Deaktivierung von DNase-Aktivität für 15 Minuten auf 100°C erhitzt und dann auf 4°C abgekühlt.
- **RNase T₁** (1986 U/μl; GIBCO/BRL, Karlsruhe)
- **T₃ und T₇ RNA Polymerase** (20 U/μl; Boehringer-La Roche, Mannheim)
- **Ribonuklease-Inhibitor** (20 U/μl; Promega, Mannheim) bzw. (35 U/μl; MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- **T₄ Polynukleotidkinase** (10 U/μl; NEB, Frankfurt)
- **Proteinase K** (14,3 mg/ml; Boehringer-La Roche, Mannheim)
- **Taq-Polymerase** (5 U/μl; Promega, Mannheim)
- **AmpliTaq Gold®** (5 U/μl; Perkin-Elmer, Weiterstadt)
- **Pfx-Polymerase** (2,5 U/μl; GIBCO/BRL, Karlsruhe)
- **MMLV-Reverse Transkriptase, RNase H⁻** (200 U/μl; Promega, Mannheim)
- **DNA Polymerase 1, Large (Klenow) Fragment** (5 U/μl; NEB, Frankfurt)

- **Alkalische Phosphatase** (10 U/μl; NEB, Frankfurt)
- **T₄ Ligase** (1 U/μl; Boehringer-La Roche, Mannheim)
- **Proteinase-Inhibitor complete™** (Boehringer-La Roche, Mannheim)

2.1.4 „Kits“

Bio-Rad Protein Assay	BIO-RAD (München)
Prime-a-Gene® Labeling System	Promega (Mannheim)
PolyA Tract® mRNA Isolation System	Promega (Mannheim)
Wizard® Plus Midiprep	Promega (Mannheim)
U.S.E. Mutagenesis Kit	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Trizol® Reagent	GIBCO/BRL (Karlsruhe)
PeqGOLD RNAPure™	peqlab (Erlangen)
Titan™ One Tube	
RT-PCR System	Boehringer (Mannheim)
T7-MEGAscript™	Ambion (Austin/USA)
T7-MEGAscript	Ambion (Austin/USA)
ZAP-cDNA® Synthesis Kit,	
ZAP-cDNA® Gigapack® III	
Gold Cloning Kit	Stratagene (La Jolla/USA)
QIAquick™ Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Gen Elute AGAROSE SPIN COLUMN	Sigma (Taufkirchen)

2.1.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Referenz	Genotyp
XL1-Blue	Bullock (1987)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
XL1-Blue MRF⁺	Jerpseth (1992)	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
SOLRTM	Stratagene, La Jolla	<i>e14'(mcrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ umuC::Tn5(Kan^r) uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R [F' proAB lacI^qZΔM15] Su⁻ (nonsuppressing)</i>
NM522 <i>mutS</i>	Pharmacia	<i>thi supE Δ(hsdMS-mcrB)5 Δ(lac-proAB) [mutS::Tn10] F' [proAB lacI^qZΔM15]</i>
JM110	Yanish-Perron (1985)	<i>rpsL (Str^r) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZ ΔM15]</i>

2.1.6 Algen-Stämme

Algen-Stamm	Genotyp	Referenz
<i>G. polyedra</i> 70	wt	Mittag <i>et al.</i> (1994)
<i>C. reinhardtii</i> 137c	wt	Harries (1989)
<i>C. reinhardtii</i> cw15	Zellwandlos, wt	Beck, (Freiburg)
<i>C. reinhardtii</i> CLS 31-8	<i>arg7⁻</i> , mt	Johnson und Suzuki, (Nashville, USA), persönliche Mitteilung
<i>C. reinhardtii</i> CLS 31-10	<i>arg7⁻</i> , mt ⁺	Johnson und Suzuki, (Nashville, USA), persönliche Mitteilung

2.1.7 Vektoren

Vektor	Referenz
pBluescript KS⁺	Stratagene (La Jolla, USA)
pBluescript SK⁺	Stratagene (La Jolla, USA)
pUC19	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pBR322	Watson, N. (1988)

2.1.8 Rekombinante Plasmide

Plasmid	inseriertes Fragment	Referenz
pMM3	<i>lbp</i> 3'-Ende	Mittag <i>et al.</i> (1994) (Abb. 3)
pMM14	<i>lbp</i> 3'-Ende (UG)	Mittag <i>et al.</i> (1994) (Abb. 4)
pAB1	<i>gs2</i> 3'-UTR mut	Waltenberger <i>et al.</i> (2001) (Abb. 5)
pHK18S4	<i>18S</i> rRNA	Gunderson <i>et al.</i> (1987) (Abb. 6)
pJD67	<i>arg7</i>	Davies <i>et al.</i> (1992) (Abb. 41)

Das Plasmid pAB1 wurde von Armin Bareiß hergestellt. Die Plasmide pHK18S4 und pJD67 wurden uns freundlicherweise von Ralf Werner bzw. John Davies zur Verfügung gestellt.

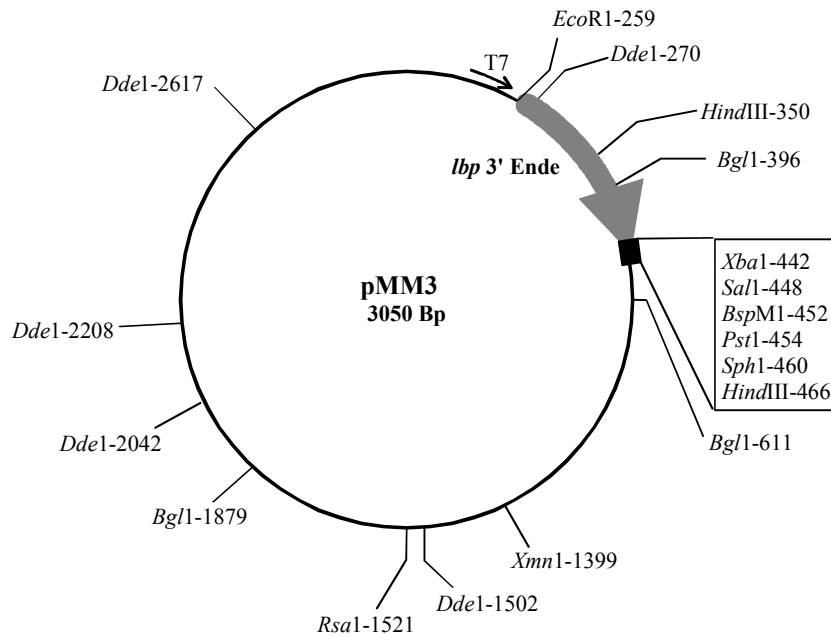


Abb. 3: Restriktionskarte des Plasmids pMM3

In den Vektor pTZ18R wurde über die Schnittstellen *Eco*R1 und *Xba*I ein 183 Bp-Fragment des *lbp* 3'-Ende (Position 2148 - 2330) aus *G. polyedra* ligiert (Mittag *et al.*, 1994). Die Transkription von T7 liefert ein Sinn-Transkript.

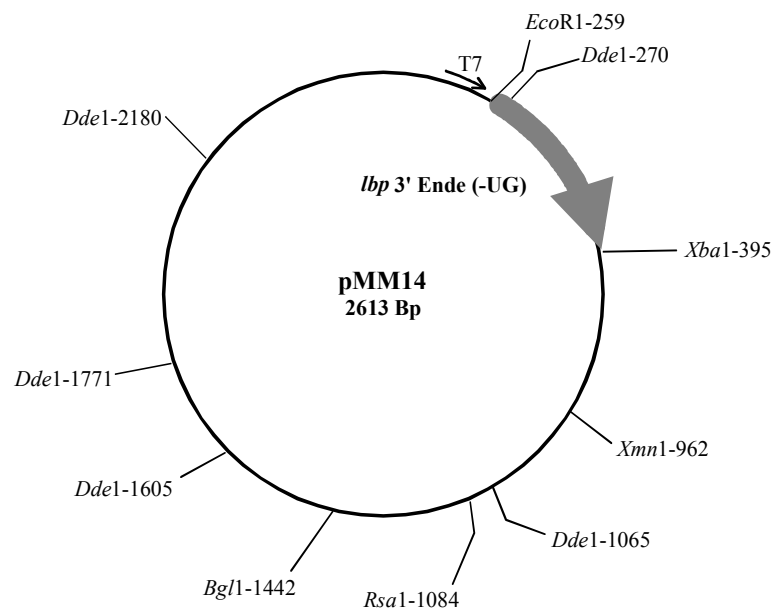


Abb. 4: Restriktionskarte des Plasmids pMM14

pMM14 leitet sich vom Plasmid pMM3 her. Es entstand durch nachfolgende Deletion eines *Sal*I/ *Dra*III-Vektor-Fragments und eines *Hind*III/*Bgl*I-Fragments aus dem *lbp* 3'-Ende, welches die „TG“-Repetition enthält.

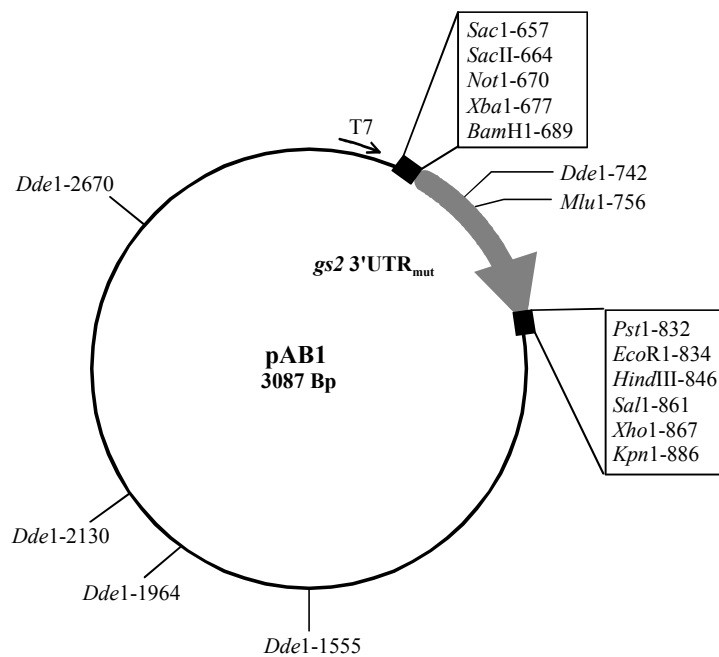


Abb. 5: Restriktionskarte des Plasmids pAB1

pAB1 leitet sich vom Plasmid pHW26 (siehe auch Abb. 22) her. Durch eine *in vitro* Mutagenese nach Deng & Nickoloff (1992) wurden sechs der sieben „TG“-Repetitionen des *gs2* 3'-UTR mutiert, dabei wurde eine Restriktionsschnittstelle für *Mlu*I neu eingeführt.

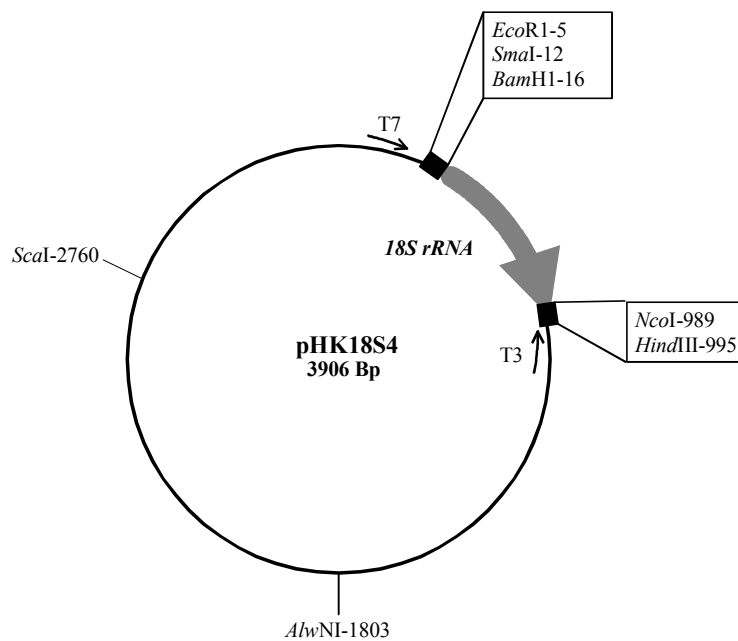


Abb. 6: Restriktionskarte des Plasmids pHK18S4

In den Vektor pH3T7BM wurde über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RV ein 970 Bp-Insert des 18S rRNA-Gens aus *C. reinhardtii* (Position 537-1506) ligiert. Die *Eco*RV-Schnittstelle fiel dadurch weg.

2.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden größtenteils von MWG-Biotech AG (Ebersberg) und GIBCO/BRL (Karlsruhe) bezogen.

Oligonukleotide für die *in vitro*-Mutagenese

Xmn1	5'-cgccccgaagagcggtttccaatg-3'
OMM27	5'-cacaacacacacatgcattaaagagatcg-3'
OMM28	5'-ccccacttgtaactgcagtggtgatcctcaaagcttaaagagatcg-3'
OMM29	5'-ccccacttgtaagtacacacaacacac-3'
OMM30	5'-ccccacttgtaactgatcacaacacacac-3'
OMM31	5'-ccccacttgtaactggatccaacacacacaaagc-3'
OMM32	5'-ccccacttgtaactgtgatatccacacacaaagc-3'
OMM34	5'-gcacacaacacacactaagcttaaagag-3'
OMM35	5'-gcacacaacacagtacaagcttaaagagatcg-3'
OMM36	5'-gtaactgcacacaacaggatccaagcttaaagagatcg-3'
OMM77	5'-ggagggggggcggggtgtgtagaattcgactgactcgtgtgtaagtctcggtggagg-3'

Oligonukleotide zur Sichtung der cDNS-Bank

OMM40	5'-(agct)cacacaacacacaca(agct)-3'
-------	-----------------------------------

Oligonukleotide zur Amplifikation von 3'-UTRs

UG3	5'-tgtgtgtgtgtgtg-3'
UG4	5'-(t) ₁₁ gc-3'
UG5	5'-(t) ₁₁ gg-3'
UG6	5'-(t) ₁₁ gt-3'
UG7	5'-(t) ₁₁ ga-3'
UG8	5'-(t) ₁₁ cc-3'
UG9	5'-(t) ₁₁ cg-3'
UG10	5'-(t) ₁₁ ct-3'
UG11	5'-(t) ₁₁ ca-3'
UG12	5'-(t) ₁₁ ac-3'
UG13	5'-(t) ₁₁ ag-3'

UG14	5'-(t) ₁₁ at-3'
UG15	5'-(t) ₁₁ aa-3'
T ₃	5'-aattaaccctcactaaagg-3'
T ₇	5'-gtaatacgactcactatagg-3'
OMM52	5'-atgcctacactcttgacaac-3'
OMM53	5'-atgactcttctgtggtgc-3'
OMM54	5'-accgattcaatggtacacag-3'
OMM55	5'-aagcttgcgagccttcaatg-3'
OMM56	5'-aacctcgctacacttattc-3'
OMM57	5'-tccatgcgcaaagttaaacc-3'

Oligonukleotide zur Amplifikation der 3'-Enden spezifischer cDNS

OMM37	5'-gagagctcgatctgagccgtg-3'
OMM38	5'-ctcgatccttgatgcgatcac-3'
OMM51	5'-ctgcagcaggtgcagaagatg-3'
OMM64	5'-tccggccgtaactctgtcac-3'
OMM66	5'-ggaagcttacgaccacatctacc-3'
OMM67	5'-aacagctgctgtgacgacg-3'
OMM68	5'-ttgccgtgtgctgacaggag-3'
OMM69	5'-cagtcgacagcaacaacagccag-3'
OMM70	5'-gaggatccgtgactcggtgtgag-3'
OMM71	5'-cacacgcacgattccaaacg-3'
OMM72	5'-gcaagtagtcagtaccgcacc-3'
OMM73	5'-gaggtaccaacctcgccgtgatc-3'
OMM90	5'-gcttcttcacggcctcagc-3'
OMM91	5'-ggtaccacacacacacac-3'
OMM92	5'-atctgcgctcccttgacg-3'
OMM93	5'-gctgtggttctttaccctcg-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von Hybridisierungssonden

OMM96	5'-cccaggcagctgctgcg-3'
OMM97	5'-ccctccccgacccgctcag-3'

OMM98 5'-ccatgcaccaacacgccacc-3'

OMM99 5'-tgagctggagcgcatgatgg-3'

Oligonukleotide für die semiquantitative RT-PCR

OMM59 5'-cacgcacacacacacatac-3'

OMM84 5'-acatgctcgccacggacttg-3'

OMM86 5'-cgcttcgctctggttaattgg-3'

OMM87 5'-cagccttgcgaccatactcc-3'

2.1.10 Molekulargewicht-Standards

DNS Standards:

Marker I: Lambda DNS/ *Bst*EII-Verdau, NEB (Frankfurt)

Fragmente: 8454 Bp, 7242 Bp, 6369 Bp, 5686 Bp, 4822 Bp, 4324 Bp, 3675 Bp, 2323 Bp, 1929 Bp, 1371 Bp, 1264 Bp, 702 Bp, 224 Bp, 117 Bp

Marker II: pBR322/ *Hae*III-Verdau, selbst hergestellt:

Fragmente: 578 Bp, 540 Bp, 504 Bp, 458 Bp, 434 Bp, 267 Bp, 234 Bp, 213 Bp, 192 Bp, 184 Bp, 124 Bp, 123 Bp, 104 Bp, 89 Bp, 80 Bp, 64 Bp, 57 Bp, 51 Bp, 21 Bp, 18 Bp, 11 Bp, 7 Bp

RNS Standard:

0,24-9,5 kB-Leiter, GIBCO/ BRL (Karlsruhe):

Fragmente: 9,49 kB; 7,46 kB; 4,4 kB; 2,37 kB; 1,35 kB; 0,24 kB

Protein Standard:

„Low Range Prestained“ SDS-Page Standard, BIO-RAD (München):

Phosphorylase B	103	kDa
BSA	76	kDa
Ovalbumin	49	kDa
Carboanhydrase	33,2	kDa

Trypsininhibitor aus Sojabohnen	28	kDa
Lysozym	19,9	kDa

2.1.11 Kulturmedien

Die Medien wurden mit vollentsalztem Wasser aus einem Ionenaustauscher angesetzt. Festmedien enthielten zusätzlich 20 g Agar pro Liter. Zur Sterilisation wurde 30 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert.

2.1.11.1 Medien für Bakterien und Phagen

<u>NZY-Medium</u>	8,6 mM NaCl; 8 mM MgSO ₄ ; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NZ Amin (Casein-Hydrolysat); pH 7,5
<u>NZY Agar</u>	1 l NZY; 1,5 % (w/v) Agar
<u>NZY Top-Agar</u>	1 l NZY; 0,7 % (w/v) Agarose
<u>SOC-Medium</u>	2 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 8,6 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glucose
<u>SM-Puffer</u>	100 mM NaCl; 8 mM MgSO ₄ ; 50 mM Tris; 0,01% (w/v) Gelatine; pH 7,5

2.1.11.2 Medien zur Anzucht von *C. reinhardtii*

<u>„trace“ (Hutner <i>et al.</i>, 1950)</u>	102,0 mM ZnSO ₄ ; 245,9 mM H ₃ BO ₃ ; 41,5 mM MnCl ₂ ; 23,9 mM FeSO ₄ ; 9 mM CoCl ₂ ; 8,4 mM CuSO ₄ ; 1,3 mM (NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ; 180 mM EDTA-Natriumsalz; pH 6,5 - 6,8
---	---

Bis auf das Na-EDTA wurden alle Salze einzeln in ddH₂O gelöst und zusammengegeben. Der Ansatz wurde dann fast auf das Endvolumen mit ddH₂O aufgefüllt, aufgeköcht und das Na-EDTA gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit KOH-Lösung ein pH-Wert zwischen 6,5 und 6,8

eingestellt und die Lösung mit ddH₂O auf das Endvolumen gebracht. Die nun grüne Lösung wurde einige Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich ein Farbumschlag nach purpur einstellte. Nach Sterilfiltration wurden Aliquots bei -20°C gelagert.

<u>Beijerinck'sche Salze</u>	300 mM NH ₄ Cl; 13,6 mM CaCl ₂ ; 4 mM MgSO ₄
<u>Salzlösung A</u>	300 mM NH ₄ Cl; 17,7 mM CaCl ₂ ; 42 mM MgCl ₂
<u>Salzlösung A-N</u>	17,7 mM CaCl ₂ ; 42 mM MgCl ₂
<u>TAP-Medium (Gorman & Levine, 1965)</u>	20 mM Tris; 1 mM (K)PO ₄ -Puffer; 25 ml Beijerinck'sche Salze; 1ml „trace“; pH 7,0
<u>TAP(A)-Medium</u>	TAP-Medium mit Salzlösung A statt Beijerinck'sche Salze
<u>TAP(A-N)-Medium</u>	TAP-Medium mit Salzlösung A-N statt Beijerinck'sche Salze
<u>HSA Medium (Sueoka <i>et al.</i>, 1967)</u>	81 µM MgSO ₄ ; 100 µM CaCl ₂ ; 8,1 mM K ₂ HPO ₄ ; 6,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 9,3 mM NH ₄ Cl; 15 mM NaAc; 1 ml „trace“; 0,3 % (w/v) Hefeextrakt; ddH ₂ O <i>ad</i> 1 l

2.1.12 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden mit vollentsalztem Wasser aus einem Ionenaustauscher angesetzt. Zur Sterilisation wurde 30 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert.

<u>10/1 TE</u>	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
<u>50/10 TE</u>	50 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0
<u>Alkalisches Lysereagenz</u>	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
<u>20x SSC</u>	3 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat; pH 7,0
<u>5x TBE</u>	445 mM Tris; 445 mM Borsäure; 16 mM EDTA

<u>40x TA</u>	1,6 M Tris; 4,56% (v/v) Essigsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,1
<u>10x STE</u>	1 M NaCl; 200 mM Tris; 100 mM EDTA; pH 7,5
<u>10x Alkalischer Puffer für DNS-Gelelektrophorese</u>	300 mM NaOH; 20 mM EDTA
<u>2x Alkalischer Probenpuffer für DNS-Gelelektrophorese</u>	20 % (v/v) Glycerin; 25 mM NaOH; 0,25% (w/v) Bromphenolblau
<u>5x MOPS</u>	100 mM MOPS; 40 mM Natriumacetat; 5 mM EDTA; pH 8,0
<u>100x Denhardt`s</u>	2 % (w/v) Ficoll; 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 2 % (w/v) BSA
<u>Denaturierungspuffer für DNS</u>	500 mM NaOH; 1,5 M NaCl
<u>Neutralisierungspuffer für DNS</u>	500 mM Tris; 3 M NaCl; pH 7,4
<u>Methylenblau-Färbelösung</u>	500 mM NaAc; 0,04% (w/v) Methylenblau; pH 5,2
<u>Zell-Aufschlußpuffer für „mobility shift“ und „UV-crosslink“</u>	80 mM NaCl; 10 mM Tris; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Glycerin; 200 nM DTT; pH 7,5; (+RNase-Inhibitor: ~50 U/ml); (+Proteinase-Inhibitor complete™: 40 µl/ml)
<u>Zell-Aufschlußpuffer für ASL Enzymtest</u>	20 mM Natriumphosphatpuffer; 200 µM DTT; 40 µl/ml Proteinase-Inhibitor complete™; pH 7,5
<u>5x Laemmli-Puffer</u>	125 mM Tris; 1,25 M Glycin; 0,5 % (w/v) SDS
<u>5x Lower Tris-Puffer</u>	1,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8
<u>4x Upper Tris-Puffer</u>	500 mM Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8
<u>2x Probenpuffer für SDS-PAGE</u>	125 mM Tris; 4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8

Lysispuffer zur DNS-Isolierung

2% (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid; 100 mM Tris; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; pH 8,0

GTC-Homogenisationspuffer

4 M Guanidinthiocyanat (GTC); 25 mM Natriumcitrat; 0,5 % (w/v) Lauroylsarkosin; 0,07% (v/v) β -Mercapthoethanol; pH 6,5

RNS-Probenpuffer I

20 mM EDTA (pH 8,0); 95 % (v/v) Formamid; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 0,05% (w/v) Xylencyanol

RNS-Probenpuffer II

97 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) Xylencyanol

RNS-Probenpuffer III

1 mM EDTA (pH 8,0); 50 % (v/v) Glycerin; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol

RNS-Elutionspuffer

195 mM NH_4Ac ; 0,1 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA (pH 8,0)

Prähybridisierungslösung

6x SSC; 1x Denhardt's; 0,5 % (w/v) SDS; 0,05% (w/v) $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 100 $\mu\text{g/ml}$ denaturierte, fragmentierte Heringssperma-DNS

Hybridisierungslösung I

50 % (v/v) Formamid; 25 % (v/v) 20x SSC; 5 % (v/v) 100x Denhardt's; 100 $\mu\text{g/ml}$ denaturierte, fragmentierte Heringssperma-DNS

Hybridisierungslösung II

7 % (w/v) SDS; 250 mM Na_2HPO_4 ; 1 mM EDTA; 0,1 % (w/v) BSA; pH 7,4

Hybridisierungslösung III

6x SSC; 1x Denhardt's; 0,05% (w/v) $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *G. polyedra*

Die Kultivierung von *G. polyedra* wurde bei Morse *et al.* (1989b) dargestellt.

2.2.2 Kultivierung von *C. reinhardtii*

2.2.2.1 Stämme/Anzuchtmedien

Stammkulturen wurden auf Agar-Festmedium kultiviert. Zur Anzucht und Ernte wurden die Kulturen in das entsprechende Flüssigmedium überführt (s. 2.1.11.2).

Stamm	Kulturmedium	Zusätze
137c	HSA	-
cw15	TAP	Sorbit (45,5 g/l)
CLS 31-8	TAP	Arginin (50 mg/l)
CLS 31-10	TAP	Arginin (50 mg/l)

2.2.2.2 Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden in einem Brutschrank bei 24°C unter ständigem Rühren angezogen. Zellen, die in einem Licht/Dunkel-Zyklus (LD-Zyklus) wuchsen, wurden 12 h lang (LD0 - LD12) Weißlicht einer Intensität von $\sim 70 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{sec}$ und 12 h lang (LD12 - LD24) Dunkelheit ausgesetzt. Zellen, die unter konstanten Bedingungen wachsen sollten, wurden zunächst in einem LD-Zyklus synchronisiert und dann zu LD0 unter Dauerschwachlicht (LL) von $\sim 26 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{sec}$ gestellt; dieser Zeitpunkt ist als LL0 definiert.

2.2.2.3 Bestimmung der Zelldichte einer *C. reinhardtii*-Kultur

Aus der Kultur wurden 90 μl steril entnommen, mit 10 μl Formaldehyd (0,37 %) versetzt und durch kurzes Schütteln gemischt. Ein Tropfen davon wurde in eine Thoma-Zählkammer (0,1 mm x 0,0025 mm) gegeben. Es wurden fünf Großkästchen ausgezählt und aus den darin enthaltenen Zellen die Zelldichte berechnet:

$$\boxed{\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellen} \times 0,5 \times 10^5 \times 1,1}$$

(1,1 = Verdünnungsfaktor)

2.2.2.4 Ernte

Kulturen, die für „mobility shift“-Experimente, Enzymtests und DNS-Isolierung vorgesehen waren, wurden in der späten log-Phase ($2 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml), Kulturen für die RNS-Isolierung bei einer Dichte von $\sim 1 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet. Die Ernte von Kulturen unter Dauerschwachlicht erfolgte erst ab dem zweiten Tag unter LL (>LL24). Zur Ernte der Zellen wurden diese durch Zentrifugation (4.500 g, 5 min, 4°C) sedimentiert, vom Medium abgetrennt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Rohextrakte aus *G. polyedra*

Die Ernte von *G. polyedra*, sowie die Herstellung des Rohextraktes ist bei Mittag *et al.* (1994) dargestellt.

2.2.4 Rohextrakte aus *C. reinhardtii*

2.2.4.1 Zellaufschluß für „mobility shift“-und „UV-crosslink“-Experimente

Das Zellsediment (137c) wurde auf Eis in ca. 1 Vol Aufschlußpuffer (+Proteinase-Inhibitor complete™: 40 µl/ml) resuspendiert. Währenddessen wurde ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß zur Hälfte mit Glaskugeln (Ø 0,25 - 0,30 mm, B. Braun Biotech [Melsungen]) gefüllt, die zweimal mit Aufschlußpuffer (ohne Proteinase-Inhibitor) gewaschen wurden. Die Zellsuspension wurde zu den Glaskugeln gegeben und durch zweimaliges heftiges Schütteln, 1 x 45 sec und 1 x 30 sec, erfolgte der Zellaufschluß. Durch eine kurze Zentrifugation sedimentierten die Glaskugeln und die Suspension konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Nach Zentrifugation (12.000 g; 10 min; 4°C) wurde der Rohextrakt als klarer Überstand abgenommen.

2.2.4.2 Zellaufschluß für Argininosuccinat-Lyase (ASL) Enzymtest

Das Zellsediment wurde auf Eis in 1,5 Vol ASL-Aufschlußpuffer (s. 2.1.12) resuspendiert. Währenddessen wurde ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß zur Hälfte mit Glaskugeln (\varnothing 0,25 - 0,30 mm) gefüllt, die zweimal mit ASL-Aufschlußpuffer (ohne Proteinase-Inhibitor) gewaschen wurden. Die Zellsuspension wurde zu den Glaskugeln gegeben und durch heftiges Schütteln, 5x 1 min, erfolgte der Zellaufschluß. Nach Zentrifugation (12.000 g; 15 min; 4°C) konnte der Rohextrakt als klarer Überstand abgenommen werden.

2.2.5 Molekularbiologische Standard-Methoden

2.2.5.1 Plasmidpreparation im kleinen Maßstab aus *E. coli*

2,5 ml LB-Medium (versetzt mit Ampicillin: 50 µg/ml) wurden mit einem *E. coli* Klon, der das relevante Plasmid enthielt, inokuliert und über Nacht in der Rolltrommel bei 37°C inkubiert. Von der dichten Zellsuspension wurden dann 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 min in der Tischzentrifuge (Hettich) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 100 µl 50/10 TE-Puffer resuspendiert. Zugabe von 150 µl Alkalische Lysereagenz und vorsichtiges Schwenken führten zur Lyse der Zellen. Das klare Lysat wurde daraufhin mit 200 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) versetzt und erneut vorsichtig geschwenkt wodurch Proteine und die genomische DNS gefällt wurden. Nach 10 minütiger Zentrifugation in der Tischzentrifuge konnte der klare Überstand abgenommen werden und die darin enthaltene Plasmid-DNS wurde mit 1 Vol Isopropanol für 30 min. bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4°C wurde die DNS sedimentiert, mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde im Rotationsverdampfer getrocknet und in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.5.2 Plasmidpreparation im großen Maßstab aus *E. coli*

100 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt) wurden mit einem *E. coli* Klon, der das relevante Plasmid enthielt, inokuliert und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert. Die Kultur wurde anschließend 5 min bei 4.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml 50/10 TE-Puffer resuspendiert, der Suspension 10 ml Alkalischer Lysereagenz zugesetzt und vorsichtig bis zum Aufklaren der Lösung geschwenkt. Das Lysat wurde mit 5 ml 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) versetzt und erneut vorsichtig geschwenkt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30 min bei 16.000 g und 4°C wurde der klare Überstand abgenommen, mit 1 Vol Isopropanol versetzt und die DNS für 1 h bei –20°C gefällt. Durch Zentrifugation für 30 min bei 16.000 g und 4°C sedimentierte die DNS und konnte so nach Dekantieren des Überstandes zunächst getrocknet und dann in 1 ml 50/10 TE-Puffer gelöst werden. RNS-Kontaminationen wurden durch einen Verdau mit 14 U RNase A und 1986 U RNase T₁ bei 37°C für 1 h entfernt. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (siehe 2.2.5.3). Die Plasmid-DNS konnte nun mit NaAc/EtOH gefällt werden (siehe 2.2.5.4). Das Sediment wurde in 100-200 µl ddH₂O aufgenommen. Die Ausbeuten lagen bei 1-2 mg Plasmid-DNS.

2.2.5.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Lösung wurde mit ½ Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0) versetzt, 1 min kräftig geschüttelt und bei ~12.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Interphase abgenommen und in der gleichen Weise nochmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach Abnahme des Überstands konnten die Nukleinsäuren ethanolisch gefällt werden.

2.2.5.4 Ethanolische Fällung von DNS

Zu einem Vol DNS-haltiger Lösung wurde 1/10 Vol NaAc (3 M, pH 7,0) und 2 Vol Ethanol (96 % (v/v)) gegeben und gemischt. Nach Fällung ü.N. bei –20°C

wurde für 30 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Sediment wurde 1 ml Ethanol (70 % (v/v)) gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Sediment an der Raumluft bzw. im Rotationsverdampfer getrocknet und anschließend im gewünschten Volumen ddH₂O oder 10/1 TE-Puffer aufgenommen.

2.2.5.5 Ethanolische Fällung von RNS

Die Fällung wurde analog zur DNS Fällung mit 1/10 Vol NaAc (3 M, pH 5,0) bzw. ½ Vol NH₄Ac (7,5 M) und 2 Vol Ethanol (96 % (v/v)) durchgeführt.

2.2.5.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Photometrische Bestimmung

Je nach erwarteter Konzentration wurden zwischen 1 und 10 µl der Nukleinsäurehaltigen Lösung mit ddH₂O auf ein Volumen von 500 µl verdünnt. In einer Quarzküvette (1 cm) wurde daraufhin gegen ddH₂O die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Eine reine Nukleinsäurepreparation ergab ein Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,7–2,0; ein niedrigerer Wert deutete auf eine Kontamination (meist mit Protein) hin. Ein OD₂₆₀ von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml bei DNS, 40 µg/ml bei RNS und 30-33 µg/ml bei Oligomeren.

Ethidiumbromid-Test zur DNS-Quantifizierung

In einer Petrischale wurden 1 µl der zu bestimmende Probe bzw. je 1 µl Plasmidstandard (0 ng/µl, 10 ng/µl, 25 ng/µl, 50 ng/µl, 100 ng/µl und 200 ng/µl) mit je 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) vermischt. Die Fluoreszenz-Intensität der Tropfen bei Betrachtung auf einem UV-Transilluminator (256 nm) erlaubte durch Vergleich von Probe und Standard eine relativ genaue Abschätzung der DNS-Konzentration der Probe.

2.2.5.7 Restriktionsverdau von DNS

2.2.5.7.1 Analytischer Restriktionsverdau

In einem 20 µl Ansatz wurden 0,1-1,0 µg DNS mit 3-10 U des Restriktionsenzym in 1x Restriktionspuffer für 3-5 h beim jeweiligen Temperatur-Optimum des Enzyms verdaut.

2.2.5.7.2 Präparativer Restriktionsverdau

In einem Gesamtvolumen von 500 µl wurden 50-100 µg DNS mit 2 U Restriktionsenzym pro µg DNS in 1x Restriktionspuffer für 3-5 h beim jeweiligen Temperatur-Optimum des Enzyms verdaut. Im Anschluß wurde das Enzym durch Extraktion einmal mit Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt (siehe 2.2.5.3). Die Plasmid-DNS konnte daraufhin mit NaAc/Ethanol gefällt werden (siehe 2.2.5.4).

2.2.5.8 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen

100 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert, bis dichte Schlieren zu sehen waren ($OD_{600} = 0,4-0,6$). Die Zellen wurden auf Eis gestellt, in einen sterilen Zentrifugenbecher abgefüllt und bei 4.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml eisgekühltem 0,1 M $CaCl_2$ durch vorsichtiges Antippen des Gefäßes über 30 min auf Eis gelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4.000 g und 4°C wurde das Zellsediment in 2 ml kalter 0,1 M $CaCl_2$ /10% (v/v) Glycerin-Lösung vorsichtig resuspendiert. 100 µl-Aliquots wurden in Eppendorfgefäße abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots kompetenter Zellen konnten für mehrere Monate bei -70°C gelagert werden.

2.2.5.9 Transformation von *E. coli* XL1-Blue

Ein 100 µl-Aliquot kompetenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut und dann mit 1 µl der jeweiligen Plasmidlösung versetzt und vorsichtig vermischt. Nach 45 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz im Wasserbad einem 42°C Hitzeschock (90 sec für XL1-Blue, 120 sec für JM110) ausgesetzt. Anschließend wurde 1 ml steriles LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ausstreichen der Suspension auf LB-Platten (mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt) wurden diese ü.N. bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnten dann Kolonien transformierter *E. coli* von der Platte gepickt werden.

2.2.5.10 Transformation von *E. coli* NM522 *mutS*

Ein 200 µl-Aliquot kompetenter *E. coli* NM522 *mutS* (Pharmacia) wurde auf Eis aufgetaut, mit 30 µl der jeweiligen Plasmidlösung versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 45 sec im Wasserbad einem 42°C Hitzeschock ausgesetzt und dann 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml steriles SOC-Medium zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert, mit leichtem Schütteln ab Beginn der 2. Stunde. Nach Zugabe von weiteren 3 ml SOC-Medium und 100 µg/ml Ampicillin wurde die Kultur ü.N. bei 37°C und ständigem Schütteln inkubiert.

2.2.5.11 Blau/weiß-Selektion auf rekombinante Plasmide

Vor dem Ausplattieren transformierter *E. coli* Zellen in Platten (Ø 9 cm) mit Festmedium (LB-Medium, NZY-Medium) wurde auf dem Medium eine Lösung aus 40 µl IPTG (23,8 mg/ml), 40 µl X-Gal (20 mg/ml in DMF) und 40 µl ddH₂O ausgestrichen und eingetrocknet. Bakterien, die mit einem rekombinanten Plasmid transformiert worden waren, wuchsen zu weiß gefärbten, Bakterien, die kein rekombinantes Plasmid enthielten, zu blau gefärbten Kolonien heran.

2.2.5.12 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNS wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann (LMU München) und von der Firma TopLab (München) durchgeführt.

2.2.5.13 Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung

Der Proteingehalt von Rohextrakten wurde mithilfe des „Bio-Rad Protein Assay“ bestimmt. Dazu wurden 2-5 µl Rohextrakt mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und anschließend 5 ml der 1:5-verdünnten „Bio-Rad Protein Assay“-Lösung zugegeben. Nach 5 min konnte die Absorption bei 596 nm gegen eine Nullprobe (ohne Rohextrakt) gemessen werden.

Die erhaltenen Absorptionswerte wurden in einer, mit nach obigem Schema erstellten, BSA-Eichkurve eingetragen und der Proteingehalt daraus graphisch ermittelt.

2.2.6 Elektrophorese von Nukleinsäuren und Proteinen

2.2.6.1 DNS-Gelelektrophorese im Agarosegel

Zur Auftrennung von DNS in Agarosegelen wurden horizontale Gelkammern unterschiedlicher Größe verwendet. Die Gel-Konzentration wurde je nach Größe der zu analysierenden DNS zwischen 0,7 und 3,2 % (w/v) gewählt. Als Puffer diente für analytische Gele ein 1x TBE-Puffer und für präparative Gele, das heißt zum Exzisieren und Ligieren eines DNS-Fragments, ein 1x TA-Puffer. Die Agarose wurde in dem jeweiligen Puffer aufgekocht und anschließend wieder auf ca. 50°C abgekühlt, ehe Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben wurde. Die Lösung konnte dann direkt auf den mit dem benötigten Kamm versehenen Gelträger gegossen werden. Nach dem Erstarren der Agarose (ca. 1 h) wurde das Gel in die mit 1x Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Der Kamm wurde entfernt und die mit DNS-Probenpuffer versetzten Proben konnten in die Taschen geladen werden. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden zusätzlich 1-2 µg eines Molekulargewichtsstandards in eine

Spur aufgetragen. In Abhängigkeit von der gewählten Gelkammer und der Größe der zu trennenden Fragmente erfolgte die Elektrophorese bei 60-120V. Zur Analyse wurde die DNS auf einem UV-Transilluminator bei 256 nm sichtbar gemacht und fotografiert. Anschließend konnte das Gel für einen „Southern“-Transfer vorbereitet werden. Waren die zu transferierenden Fragmente > 6 kB wurde das Gel zunächst für 30 min in 0,25 M HCL inkubiert. Darauf folgte eine 30 minütige Inkubation in Denaturierungspuffer, gefolgt von einem Waschschrift mit ddH₂O. Zuletzt wurde 60 min in Neutralisationspuffer inkubiert und nochmals mit ddH₂O gewaschen.

2.2.6.2 Denaturierende DNS-Gelelektrophorese im alkalischen Agarosegel

Die denaturierende DNS-Gelelektrophorese wurde in einer horizontalen Gelkammer mit einem Gelträger der Größe 5,5 x 7,5 cm durchgeführt. Für das 1 %ige (w/v) alkalische Agarosegel wurden 0,8 g Agarose in 72 ml ddH₂O gelöst, aufgeköcht und auf ~55°C abgekühlt, ehe 8 ml 10x Alkalischer Puffer zugegeben wurden. Das Gel wurde sofort auf den Gelträger gegossen. Nach dem Erhärten konnte das Gel in die mit 1x Alkalischem Puffer gefüllte Kammer überführt werden und Marker und Proben, die zuvor mit 1 Vol 2x Alkalischem Probenpuffer versetzt worden waren, konnten geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte über 2 ½ h bei 75 mA. Zur Analyse wurde die Markerspuren abgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt, während auf das restliche Gel ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham) aufgelegt und für 2 ½ h belichtet wurde.

2.2.6.3 DNS-Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel

Die Elektrophorese wurde in einem vertikalen Gelsystem zwischen zwei Glasplatten der Größe 13 x 15 cm durchgeführt.

Um ein späteres Anheften des Gels an den Glasplatten zu verhindern mußten diese in regelmäßigen Abständen silanisiert werden. Dazu wurde die innere Seite der einen Glasplatte intensiv mit Silan (Sigma) eingerieben, die der andere

Glasplatte etwas schwächer. Nach 5 minütiger Inkubation wurden beide Flächen mehrmals mit 90 % (v/v) Ethanol gründlich von Silan-Rückständen befreit.

Für den Zusammenbau des Gels wurden „spacer“ der Dicke 0,8 mm gewählt. Es wurden 50 ml eines 5 %igen Polyacrylamidgels hergestellt. Dieses setzte sich aus 16,6 % (v/v) „rotiphorese® 30“ Acrylamid-Stammlsg. (30 % [w/v] Acrylamid, 0,8 % [w/v] Bisacrylamid, Roth), 10 % (v/v) Glycerin und 1x TBE-Puffer zusammen. Zum Start der Polymerisation wurden 1 % APS (10 % [w/v]) und TEMED zu einer Endkonzentration von 0,04 % (v/v) zugegeben. Das Gel wurde zwischen die beiden Glasplatten gegossen und ein Kamm wurde eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels (ca. 1h) wurde es in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Kammer eingespannt, der Kamm wurde gezogen und Proben, sowie ein Molekulargewichtsstandard konnten geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 112 V bis die Bromphenolblau-Bande 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Anschließend wurden die Glasplatten entfernt und das Gel 10 min in 1x TBE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid bei leichtem Schütteln inkubiert. Auf einem UV-Transilluminator konnten die Banden dann sichtbar gemacht und fotografiert werden. Zur Detektion radioaktiv-markierter Fragmente wurde das Gel nach dem Lauf auf Filterpapier (GB 002, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen und auf einem Gel Trockner getrocknet. Anschließend konnte das Ergebnis durch Auflegen eines Röntgenfilms oder über den „Image plate reader“ (s. 2.2.14) ausgewertet werden.

2.2.6.4 RNS-Gelelektrophorese im Agarosegel

Die Elektrophorese von RNS erfolgte in einer horizontalen Gelkammer auf einem Gelträger der Größe 12 x 14 cm. Um RNase-freie Bedingungen zu schaffen wurde die Gelkammer zuvor für mindestens 2 h mit 3 % (v/v) H₂O₂ inkubiert und anschließend mehrmals mit DEPC-behandeltem ddH₂O (s. 2.2.7.2) ausgespült. Alle verwendeten Glas- und Kunststoffwaren sowie Lösungen waren, soweit möglich, autoklaviert worden. Das denaturierende Agarosegel enthielt 1 % (w/v) Agarose, 1x MOPS-Puffer und 5,55 % (v/v) deionisiertes Formaldehyd. Zunächst wurden die Agarose, der Puffer und die entsprechende Menge Wasser aufgekocht,

und dann wieder auf ca. 50°C abgekühlt. Nachdem das Formaldehyd unter Rühren zugegeben worden war, konnte direkt das Gel auf den Träger gegossen werden. Nach dem Auspolymerisieren der Agarose wurde das Gel dann in die Gelkammer mit 1x MOPS-Puffer überführt und die Proben konnten geladen werden. Ein Probenansatz enthielt bis zu 30 µg RNS, 0,5x MOPS-Puffer, 6,5 % (v/v) Formaldehyd (deionisiert) und 50 % Formamid (v/v) (deionisiert). Der Ansatz wurde 15 min auf 65°C erhitzt, kurz auf Eis gestellt, zentrifugiert und dann mit 0,1 Vol RNS-Probenpuffer III versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V bis die Xylencyanol-Bande die Unterkannte des Gels erreicht hatte. Zur Vorbereitung des Gels für den „Northern“-Transfer wurde es zunächst mehrmals in DEPC-behandeltem ddH₂O gewaschen. Darauf folgte eine 20 minütige Inkubation in 0,05 N NaOH, ein weiteres Waschen in DEPC-behandeltem ddH₂O und eine 45 minütige Inkubation in 20x SSC-Puffer.

2.2.6.5 Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran

Den Transfer von DNS auf eine Membran bezeichnet man auch als „Southern“-Transfer, den von RNS als „Northern“-Transfer.

Das entsprechend vorbereitete DNS- bzw. RNS-Gel wurde auf ein mit 20x SSC-Puffer getränktes Filterpapier (GB 002, Schleicher & Schüll, Dassel) gelegt, dessen Enden in einen ebenfalls mit 20x SSC-Puffer gefüllten Behälter ragten. Anschließend wurde eine in 2x SSC getränkte Nylonmembran (Hybond N für „Southern“-Transfer bzw. Biodyne B für „Northern“-Transfer), die die Größe des Gels hatte, aufgelegt. Es folgten 3 Lagen in 2x SSC getränktes Filterpapier (GB 002, Schleicher&Schüll, Dassel), 3 Lagen trockenes Filterpapier und ein Stapel saugfähiges Papier. Zuletzt wurde die Apparatur mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach Abbau der Apparatur wurde die Nylonmembran zunächst getrocknet und dann für 2 h bei 80°C inkubiert. Die Membran konnte nun zur Färbung (nur bei RNS möglich) oder zur Hybridisierung mit markierten RNS- oder DNS-Sonden verwendet werden.

2.2.6.6 Methylenblau-Färbung von membrangebundener RNS

Die Membran wurde zunächst 15 min in 5 % (v/v) Essigsäure inkubiert. Nach sorgfältigem Abtropfen der Essigsäure wurde die Membran in die Methylenblau-Färbelösung überführt. Nach 10 minütiger Färbung unter leichtem Schütteln wurde die Membran mehrmals mit ddH₂O bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes gewaschen.

2.2.6.7 Denaturierende Gelelektrophorese für die Auftrennung von RNS-Transkripten

Die elektrophoretische Auftrennung von RNS-Transkripten unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in einer vertikalen Gelkammer zwischen silanisierten Glasplatten von 13 x 15 cm mit einem Kamm und „spacern“ von 0,8 mm Dicke. Für das 5,0 %ige Acrylamid-Gel wurden 1x TBE-Puffer, 7 M Harnstoff und 1/6 Vol Acrylamid-Stammlsg. (30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid) vereinigt, über Nitrocellulose (Protran®, 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert und entgast. Durch Zugabe von 0,12 % (w/v) APS (Stammlösung: 10 % [w/v]) und 0,04 % (v/v) TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Das Gel wurde daraufhin direkt zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren konnte das Gel in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingespannt und der Kamm gezogen werden. Es folgte eine Vorelektrophorese für 20 min bei 200 V, ehe die mit RNS-Probenpuffer I versetzten Proben geladen und bei 150 V aufgetrennt werden konnten. Die Elektrophorese wurde gestoppt wenn die Bromphenolblau-Bande 2/3 der Länge des Gels durchlaufen hatte.

2.2.6.8 Gelelektrophorese für die Auftrennung von nativen RNS/Proteinkomplexen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNS/ Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen erfolgte in einer vertikalen Gelkammer zwischen silanisierten Glasplatten von 13 x 15 cm mit einem Kamm und „spacern“ von 1,5 mm Dicke. Für das 3,9 %ige Acrylamidgel wurden 0,5x TBE-Puffer, 1/10 Vol Acrylamid-

Stammlsg. (39 % [w/v] Acrylamid, 1 % [w/v] N,N'-Methylen-bis-acrylamid, filtrierte über Protran® Nitrocellulose, 0,45 µm, Schleicher&Schüll, Dassel) und 10 % (v/v) Glycerin vereinigt und entgast. Durch Zugabe von 0,1 % (w/v) APS (Stammlsg.: 10 % [w/v]) und 0,04 % (v/v) TEMED wurde die Polymerisation gestartet, das Gel wurde direkt zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren konnte das Gel in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingespannt und der Kamm gezogen werden. Nach einer 2 stündigen Vorelektrophorese bei 200 V konnten dann die mit RNS-Probenpuffer II versetzten Proben auf das Gel geladen und für ca. 3 ½ Stunden, bis zum Auslaufen der Xylencyanol-Bande, bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt werden.

2.2.6.9 Denaturierende Proteingel-Elektrophorese (Laemmli, 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in einer vertikalen Gelkammer zwischen silanisierten Glasplatten von 13 x 15 cm mit einem Kamm und „spacern“ von 1,2 mm Dicke. Die Elektrophorese wurde in einem 12,5 %igen SDS/Polyacrylamidgel durchgeführt. Für das Trenngel wurden 0,42 Vol Acrylamid-Stammlösung (30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bis-acrylamid), 1/5 Vol 5x Lower Tris-Puffer und ddH₂O zusammengegeben und entgast. Die Polymerisation wurde dann durch Zugabe von 0,1 % (w/v) APS (Stammlsg. 10 % (w/v)) und 0,04 % (v/v) TEMED gestartet. Das Gel wurde gegossen und direkt mit ddH₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Wasser vollständig abgenommen. Für das Sammelgel wurden 1/10 Vol Acrylamid-Stammlösung (30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bis-acrylamid), ¼ Vol 4x Upper Tris-Puffer und Wasser zusammengegeben. Durch Zugabe von 0,3 % (w/v) APS (Stammlsg. 10 % (w/v)) und 0,1 % (v/v) TEMED wurde die Polymerisation gestartet. Das Sammelgel wurde direkt auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war konnte der Kamm gezogen und das Gel in die mit 1x Laemmli-Puffer gefüllte Kammer eingesetzt werden. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 Vol 2x Probenpuffer bzw. 1/3 Vol Roti-Load® (Roth,

Karlsruhe) versetzt und für 5 min gekocht. Als Größenstandard wurde der „Low Range SDS-Page Standard“ mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V im Sammelgel und 150 V im Trenngel bis die Xylencyanol-Bande aus dem Gel ausgelaufen war.

2.2.7 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren aus *C. reinhardtii*

2.2.7.1 Isolierung von genomischer DNS

Um die genomische DNS nicht zu fragmentieren wurden für die Isolierung nur 1 ml-Spitzen mit erweiterter Öffnung verwendet. Eine Probe aus ~25 ml Kultur wurde aufgetaut und bei 65°C für 1 h mit 1 ml Lysispuffer unter gelegentlichem, vorsichtigem Umrühren inkubiert. Durch Zugabe von 0,7 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,5 – 8,0) und vorsichtigem Schwenken für mehrere Minuten konnten die Proteine denaturiert werden. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C wurde die obere Phase abgenommen und die darin enthaltene DNS mit 1 Vol Isopropanol durch 15 minütige Inkubation auf Eis gefällt. Es wurde erneut zentrifugiert (12.000 g, 15 min, 4°C), die sedimentierte DNS wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (s. 2.2.5.4) und bei RT getrocknet. Das Sediment konnte daraufhin in 300 µl TE-Puffer (10/1) bei 65°C unter vorsichtigem Umrühren gelöst werden. Durch eine anschließende Inkubation (37°C, 30 min) mit 7,5 µl RNase A (10 µg/µl) wurde die RNS degradiert. Vorsichtiges Schwenken mit je 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,5–8,0) führte zu einer Denaturierung der RNase. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C wurde die obere Phase abgenommen und mit 1 Vol Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) erneut vorsichtig geschüttelt. Durch eine 10 minütigen Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C erfolgte Phasentrennung, der Überstand wurde abgenommen und durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Na-Acetat (pH 7,0) und 1 Vol Isopropanol die DNS in einer 15 minütigen Inkubation auf Eis erneut gefällt. Nach Zentrifugation (12.000 g, 30 min, 4°C) und Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol konnte das Sediment bei RT getrocknet werden. Durch Inkubation mit 50 µl TE-Puffer (10/1)

bei 65°C wurde die DNS schließlich wieder in Lösung gebracht. Die Lagerung der DNS erfolgte bei -20°C. Vor Entnahme eines Aliquots wurde die Lösung mindestens 10 min auf 60°C erwärmt

2.2.7.2 Isolierung von RNS

C. reinhardtii Kulturen wurden in der mittleren log-Phase ($\sim 1 \times 10^6$ Zellen/ml) durch Zentrifugation (4.500 g, 5 min, 4°C) geerntet.

Alle Lösungen für die RNS-Isolierung wurden mit 1ml/l Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und mindestens 8 Stunden unter Rühren bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreißig Minuten bei 121°C und 1 bar Druck autoklaviert. Die verwendeten Glas- und Kunststoffwaren waren, soweit möglich, autoklaviert worden.

Zur Isolierung von RNS wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

Guanidinthiocyanat-Methode (zur Isolierung von RNS aus dem Stamm 137c)

Die gefrorenen Zellen aus 1 l Kultur wurden in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser gegeben und mit 15 ml GTC-Homogenisationspuffer unter Reiben aufgeschlossen. Das Homogenat wurde mit 1 Vol saurem Phenol (pH 4,5 - 5) für 15 min kräftig geschüttelt. Zugabe von ½ Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und 10 minütiges Schütteln führte zur Phasentrennung. Der Ansatz wurde zentrifugiert (25.000 g, 10 min, 4°C), der Überstand abgenommen und verbliebene Proteine ein weiteres Mal durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH4,5-5) und 15 minütigem Schütteln denaturiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (25.000 g, 10 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde so noch zweimal und ein weiteres Mal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Die RNS im Überstand wurde mit ½ Vol Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 Vol Ethanol (96 % (v/v)) ü.N. gefällt. Nach Zentrifugation (25.000 g, 30 min, 4°C) wurde die sedimentierte RNS mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und bei

50 -60°C in DEPC-behandeltem ddH₂O gelöst. Die Ausbeute betrug 2–5 mg RNS.

Isolierung mit Trizol®Reagent bzw. PeqGOLD RNAPure™ (zur Isolierung von RNS aus dem Stamm cw15)

Zu einem gefrorenen Pellet von $\sim 3 \times 10^7$ Zellen wurde 1 ml kalte (4°C) Lysereagenz gegeben und sofort durch Auf- und Abpipettieren für eine vollständige Lyse der Zellen gesorgt. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis und zweimaligem Mischen konnten unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 UpM und 4°C in der Tischzentrifuge (Eppendorf) sedimentiert werden. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und 30 sec durch heftiges Schütteln gemischt. Nach 3 minütiger Inkubation bei RT wurde für 15 min bei 12.000 UpM und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der klare Überstand (~ 500 µl) wurde abgenommen. Die RNS konnte nun mit 220 µl Isopropanol und 220 µl Hochsalzlösung (0,8 M Natriumcitrat, 1,2 M NaCl) gefällt werden. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde für 10 min bei 12.000 UpM und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNS-Sediment wurde durch 30 sec Schütteln mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 7.500 UpM und 4°C in der Tischzentrifuge wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Sediment kurz an der Raumluft getrocknet und anschließend in 100 µl DEPC-behandeltem ddH₂O für 10 min bei 55°C gelöst. Die Ausbeute lag bei 45–75 µg RNS.

2.2.7.3 Isolierung von Poly(A)⁺RNS

Die Isolation wurde nach dem Protokoll für das „Small Scale PolyA Tract®mRNA Isolation System“ (Promega) durchgeführt. Dazu wurde 1 mg RNS in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 500 µl gebracht und dann für zehn Minuten im Wasserbad auf 65°C erhitzt. Direkt nachdem die Lösung aus dem Wasserbad entnommen worden war gab man 3 µl biotinylierte Oligo(dT) Probe und 13 µl 20x SSC zu und mischte vorsichtig.

Während die Lösung langsam auf Raumtemperatur abkühlte (ca. 10 min) wurden die Streptavidin-Paramagnetischen-Partickel (SA-PMPs) dreimal mit je 0,3 ml 0,5x SSC gewaschen und in 0,1 ml 0,5x SSC resuspendiert. Nach Zugabe der 516 µl aus der Anlagerungsreaktion wurde der Ansatz zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten vier Waschschrte mit jeweils 0,3 ml 0,1x SSC, ehe die Poly(A)⁺RNS einmal mit 0,1 ml und einmal mit 0,15 ml RNase-freiem Wasser von den SA-PMPs eluiert wurde. Die Ausbeute lag bei 1–5 µg Poly(A)⁺RNS.

2.2.7.4 Radioaktive Markierung von cDNS-Sonden

Die Markierung wurde mit dem „Prime-a-Gene®Labeling System“ (Promega) durchgeführt: dazu wurden 20 ng cDNS in einem Eppendorfgefäß mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 30 µl gebracht, für zwei Minuten bei 95°C im Thermocycler denaturiert und anschließend sofort in einem Eisbad gekühlt. Für einen 50 µl Standardansatz gab man 10 µl Reaktionspuffer (5x), je 1 mmol der Nukleotide dATP, dGTP, dTTP, 20 µg Nuklease-freies BSA, 1,67 pmol [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) und 5 U DNS-Polymerase 1 („large Klenow-Fragment“) dazu. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 1–3 h bei RT inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Abtrennung der nicht-eingebauten Nukleotide mithilfe des „QIAquick™ Nucleotide Removal Kit“ (s. 2.2.7.5). Vor Gebrauch wurde die markierte DNS durch eine 10 minütige Inkubation bei 95°C denaturiert.

2.2.7.5 Abtrennung nicht-eingebauter Nukleotide

Die Abtrennung nicht-eingebauter Nukleotide erfolgte mit dem „QIAquick™ Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen). Dazu wurde der Reaktionsansatz in 10 Volumen Puffers PN1 gelöst, auf eine „QIAquick spin column“ gegeben und eine Minute in der Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule noch zweimal mit je 500 µl Puffer PE durch Zentrifugation für eine Minute bei 12.000 g gewaschen. Die DNS konnte

daraufhin mit 200 µl Puffer EB durch Zentrifugation für eine Minute in der Tischzentrifuge von der Säule eluiert werden.

2.2.7.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die Markierung von Oligonukleotiden erfolgte durch Phosphorylierung mit [γ - ^{32}P]dATP am 5'-Ende. Dazu wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz 200 ng Oligonukleotid, 1x Polynukleotidkinase-Puffer, 6 µl [γ - ^{32}P]dATP (3000 Ci/mmol) und 10 U T4-Polynukleotidkinase vereinigt und anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Nicht-eingebaute Nukleotide konnten anschließend mithilfe des „QIAquick™ Nucleotide Removal Kit“ (s. 2.2.7.5) entfernt werden.

2.2.7.7 Hybridisierung mit cDNS-Sonden

„Southern“-Hybridisierung

Die Membran wurde 5 min mit 20 ml 3x SSC bei 50°C gewaschen. Die Lösung wurde durch 15 ml Hybridisierungslösung I ersetzt und es wurde 3 h bei 50°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Im Anschluß erfolgte ü.N. bei 50°C die Hybridisierung in 5 ml Hybridisierungslösung I, der zuvor die denaturierte DNS-Sonde zugesetzt worden war. Am nächsten Tag wurde die Membran dann für 3 h bei 50°C mit mehrmaligem Pufferwechsel (je 100 ml 2x SSC/0,1 % (w/v) SDS) gewaschen. Zur Detektion wurden ein Röntgenfilm bzw. eine „Image Plate“ belichtet (s. 2.2.14).

„Northern“-Hybridisierung

Die Membran wurde 5 min mit 20 ml 3x SSC bei 67°C gewaschen. Die Lösung wurde durch 20 ml Hybridisierungslösung II + 0,1 mg/ml denaturierte und fragmentierte Heringssperma-DNS ersetzt und 5 h bei 67°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Im Anschluß erfolgte für 22 h bei 67°C die Hybridisierung in 5 ml Hybridisierungslösung II, der zuvor die denaturierte DNS-Sonde zugesetzt worden war. Zum Waschen der Membran folgte zunächst eine zweiminütige Inkubation bei 30°C in 50 ml 2x SSC/ 0,5% (w/v) SDS. Dann

wurde 15 min bei 30°C mit 50 ml 2x SSC/ 0,1 % (w/v) SDS und 30 min bei 37°C mit 500 ml 0,1x SSC/ 0,5% (w/v) SDS gewaschen. Zeigte die Membran daraufhin noch eine deutliche Hintergrundstrahlung, wurde noch ein weiteres Mal für 30 min bei 67°C mit 0,1x SSC/ 0,5% (w/v) SDS gewaschen. Zur Detektion wurden ein Röntgenfilm bzw. eine „Image Plate“ belichtet (s. 2.2.14).

2.2.7.8 Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde OMM40

Die Membran wurde 5 min in 3x SSC bei RT gewaschen. Dann wurde die Lösung gegen 15 ml Prähybridisierungslösung ausgetauscht und 3 h bei 37°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Im Anschluß erfolgte ü.N. bei 37°C die Hybridisierung in 5 ml Hybridisierungslösung III, der zuvor die Oligonukleotid-Sonde zugesetzt worden war. Zum Waschen der Membran folgte zunächst eine einstündige Inkubation bei RT in 100 ml 3x SSC/0,05 % (w/v) Natriumpyrophosphat mit mehrmaligem Pufferwechsel. Daraufhin wurde mit dem gleichen Puffer eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zeigte die Membran daraufhin noch eine deutliche Hintergrundstrahlung, wurde noch ein weiteres Mal mit diesem Puffer für 10 min bei 42°C gewaschen. Zur Detektion wurden ein Röntgenfilm bzw. eine „Image Plate“ belichtet (s. 2.2.14).

Die Hybridisierungstemperatur wurde nach Sambrook *et al.* (1989) mit 37°C angesetzt (Hybridisierungstemperatur für Oligonukleotide von 15-22 Basen Länge). Eine Berechnung der Hybridisierungstemperatur (T_A) nach Sambrook *et al.* (1989) führte zu einem vergleichbaren Ergebnis:

$$T_a = T_m - (5 \text{ bis } 12^\circ\text{C})$$

$$\text{mit } T_m = 4^\circ\text{C}(\text{G+C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A+T})$$

Die minimale Hybridisierungstemperatur (variable Basen am 5'- und 3'-Ende sind ein „A“ oder „T“) für OMM40 beträgt somit:

$$T_a (\text{OMM40}) = 48^\circ\text{C} - (5 \text{ bis } 12^\circ\text{C}) = \underline{43^\circ\text{C bis } 36^\circ\text{C}}$$

Die maximale Temperatur zum Waschen der Membranen wurde 5-6°C geringer als die Schmelztemperatur des Oligonukleotids angesetzt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.8 Transformation von *C. reinhardtii*

Die Transformationsexperimente wurden freundlicherweise von Herrn Jens Grosch durchgeführt.

Eine Paarung von *C. reinhardtii* ist nur nach der Auflösung der Zellwand möglich; aus diesem Grund produzieren sich paarende *C. reinhardtii* das Enzym Autolysin, das die Auflösung der Zellwand bewirkt. Indem man *C. reinhardtii* zur Paarung stimuliert läßt sich Autolysin gewinnen, mit dem dann die Zellwände der zu transformierenden Zellen aufgelöst werden können. In die somit vorübergehend zellwandfreien Zellen läßt sich daraufhin, durch kräftiges Schütteln mit Glaskugeln, die entsprechende DNS einführen.

2.2.8.1 Gewinnung von Autolysin (modifiziert nach Harris, 1989)

Zur Herstellung von Autolysin wurden die *C. reinhardtii*-Stämme CLS 31-8 (mt⁻) und CLS 31-10 (mt⁺) verwendet. Die Zellen wurden jeweils getrennt in 100 ml TAP(A)-Medium (+ Arg.) bis zu einer Dichte von $4-5 \times 10^6$ Zellen/ml angezogen und dann für 5 min bei 1.300 g (4°C) abzentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in je 80 ml TAP(A-N)-Medium aufgenommen und für 16 bis 19 h unter Dauerlicht weiter kultiviert. Durch die Vereinigung von jeweils 10 µl beider Kulturen konnte unter dem Mikroskop überprüft werden, ob eine Paarung erfolgte. Nach Bestimmung der Zellzahl beider Stämme wurden die Kulturen für 5 min bei 1.800 g (4°C) zentrifugiert und in jeweils 10 ml TAP(A-N)-Medium zu 1×10^9 Zellen/ml resuspendiert. Die Paarung erfolgte mit Vereinigung der beiden Kulturen und weiterer Kultivierung bei Dauerlicht für maximal 2 h. Zur Kontrolle des Fortgangs wurden alle 15 min 10 µl Kultur entnommen und mit 10 µl 1 % (v/v) Triton gemischt. Konnte, durch Kontrolle unter dem Mikroskop, nach maximal 5 min der Tod der Zellen festgestellt werden, so wurde die Kultur für 10 min bei 20.000 g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand, der das Autolysin enthält,

wurde abgenommen und ein weiteres Mal für 30 min bei 25.000 g (4°C) zentrifugiert. Die klare Lösung konnte bei -20°C eingefroren oder direkt für eine Transformation eingesetzt werden.

2.2.8.2 Transformation (nach Kindle, 1990)

Eine Kultur der Stämme CLS 31-8 bzw. CLS 31-10 (beide *arg7*) wurde in 100 ml TAP(A)-Medium (+Arg.) bis zu einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml angezogen und die Zellen dann für 5 min bei 1.800 g (4°C) zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellsediments in 5 ml TAP(A)-Medium wurden 30 ml sterilfiltrierte Autolysin-Lösung zugegeben und die Kultur für 2 h bei Dauerlicht kultiviert. Der Fortgang der Zellwandlyse konnte wie bei der Autolysin-Gewinnung durch einen Test mit 1 % (v/v) Triton überwacht werden. Nach Lyse der Zellwände wurde das Medium durch Zentrifugation für 5 min bei 700 g (10°C) abgetrennt und das Zellsediment in 1,2 ml TAP(A)-Medium resuspendiert. Zur Transformation vereinigte man 300 µl der Zellsuspension, 300 mg Glasperlen (\varnothing 0,45 – 0,50 mm [B. Braun, Melsungen]), 100 µl PEG (20 % (w/v)) und 20 µg Plasmid-DNS und schüttelte heftig für 15 sec. Die Selektion auf transformierte Zellen erfolgte durch Ausplattieren auf TAP-Medium (-Arg., +Sorbit). Die Plasmid-DNS wurde sowohl in linearer als auch zirkulärer Form zur Transformation verwendet.

2.2.9 *in vitro*-Mutagenese von DNS

Die ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese von DNS wurde mithilfe des „U.S.E. Mutagenesis Kit“ von Amersham/Pharmacia, basierend auf dem Protokoll von Deng & Nickoloff (1992), durchgeführt (Abb. 7). Dazu benötigte man ein Selektions-Oligonukleotid, das eine fehlerhafte Erkennungssequenz für eine singuläre Schnittstelle (*Xmn*I) im Plasmid enthielt und ein mutagenes Oligonukleotid, das die zu mutierende Sequenz in der Form beinhaltete, daß es gleichzeitig eine neue Schnittstelle einfügte. Im ersten Schritt wurden das Selektions-Oligonukleotid (*Xmn*I-Oligonukleotid) und das Mutations-Oligonukleotid phosphoryliert. Dazu wurden in einem 20 µl-Ansatz 100 pmol

Oligonukleotid, 40 nmol ATP, 1x PNK-Puffer (NEB) und 10 U T4-PNK (NEB) vereinigt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 10 minütige Inkubation bei 65°C. In der nachfolgenden Anlagerungsreaktion wurden 0,025 pmol des zu mutierenden Plasmids mit je 25 pmol beider Oligonukleotide und 1x OPA⁺-Puffer zu einem 20 µl-Ansatz vereinigt. Zur exakten Anlagerung der Oligonukleotide an die komplementäre Sequenz im Plasmid-Einzelstrang wurde der Ansatz im Thermocycler zunächst 5 min auf 100°C erhitzt und dann 10 min bei 25°C und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte mit Zugabe von 7 µl Nukleotid-Mix (2,86 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 4,34 mM ATP; 1,43x OPA⁺-Puffer) und 3 µl Reaktions-Mix (FPLCpure®T4 DNA Ligase [0,83-1,17 kU/ml]; FPLCpure®T4 DNA Polymerase [0,83-1,67 kU/ml]; T4 Gen32 Protein [0,2-0,28 mg/ml]) und einer 1 stündigen Inkubation bei 42°C die Polymerisation der komplementären Stränge. In einem 50 µl-Ansatz wurde daraufhin der komplette Polymerase-Ansatz mit 12 U *Xmn*1 (NEB) in 0,4x OPA⁺-Puffer einem Restriktionsverdau unterzogen. 30 µl der verdauten DNS wurden dann in den *E.coli* Stamm NM522 *mutS* transformiert (s. 2.2.5.10). Von ausgewählten Kolonien wurde die Plasmid-DNS isoliert und jeweils 0,5 µg wurden einem erneuten Restriktionsverdau mit *Xmn*1 unterzogen. 10 µl Reaktionsansatz wurden in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert (s. 2.2.5.9), von ausgewählten Klonen die Plasmid-DNS isoliert und diese einem Kontrollverdau auf die mit dem mutagenen Oligonukleotid eingeführte Restriktionsschnittstelle unterworfen.

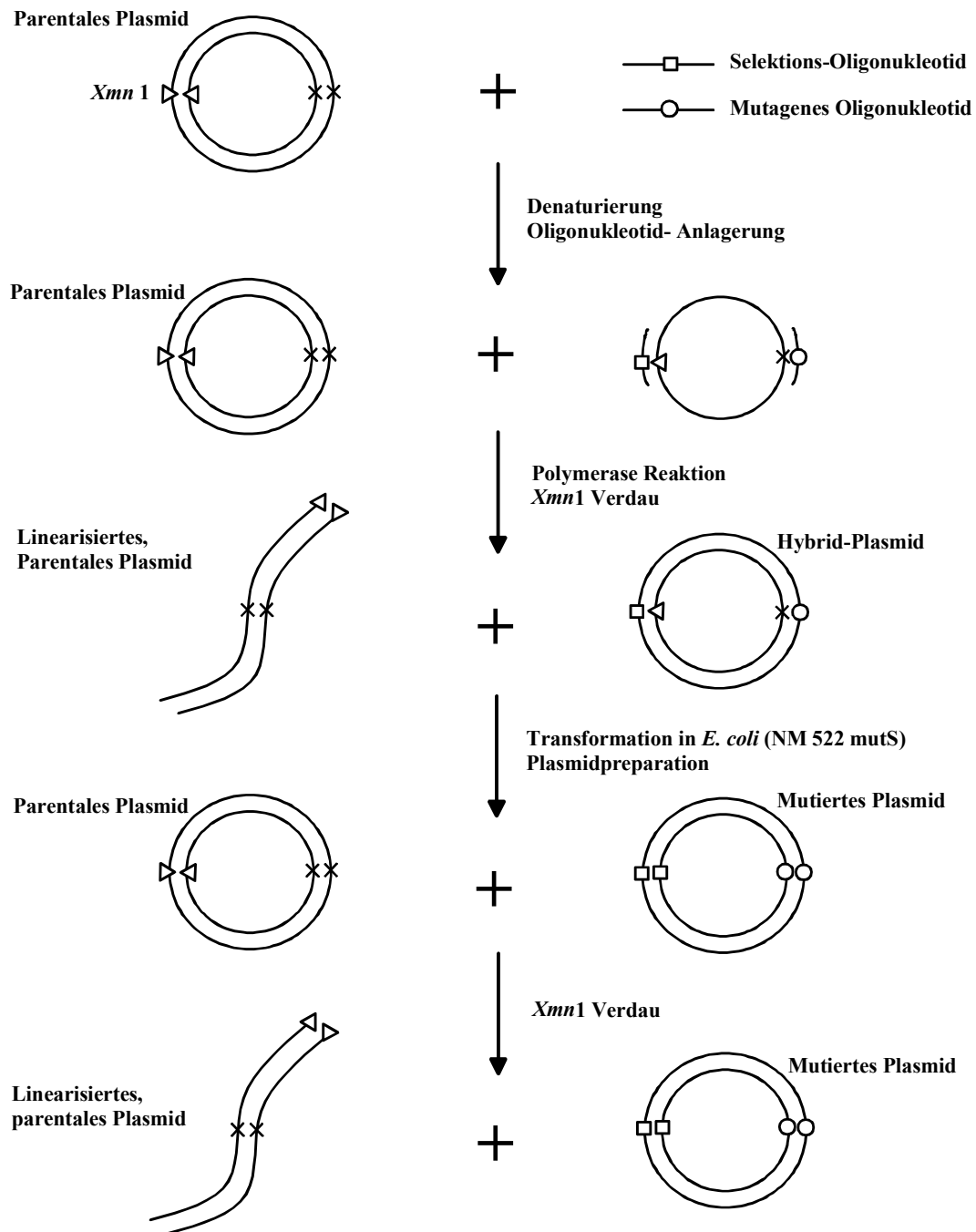


Abb. 7: Ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese nach Deng & Nickoloff (1992)

Nach Denaturierung des Plasmids werden das mutagene Oligonukleotid, das die zu mutierende Sequenz enthält, und das Selektions-Oligonukleotid, das die Sequenz für eine defekte *Xmn*1 Schnittstelle enthält, an einen der Einzelstränge angelagert. Durch die Polymerase wird dann ein komplementärer Plasmidstrang synthetisiert, der die beiden Oligonukleotide mit den veränderten Sequenzen beinhaltet. In einen mutationssensitiven *E. coli* Stamm transformiert, wird von beiden Strängen aus das Plasmid repliziert. Ein nachfolgender *Xmn* 1-Verdau linearisiert die parental Plasmide, während die mutierten Plasmide nicht mehr geschnitten werden können, und so wieder erfolgreich in *E. coli* transformiert und repliziert werden können.

2.2.10 Herstellung und Sichtung einer cDNS-Bank aus *C. reinhardtii*

2.2.10.1 Synthese der cDNS-Bank

Die cDNS-Bank wurde mithilfe des „ZAP-cDNA® Synthesis Kit“ von Stratagene synthetisiert. Eine *C. reinhardtii*-Kultur (137c) wurde zu LD10 geerntet (s. 2.2.2.4) und Poly(A)⁺ mRNS daraus isoliert (s. 2.2.7.2 und 2.2.7.3).

Erststrangsynthese

Es wurden 5 µg der Poly(A)⁺ mRNS mit DEPC-behandeltem ddH₂O auf 37,5 µl aufgefüllt, ehe die folgenden Kitkomponenten zugegeben wurden: 5 µl 10x „first strand buffer“, 3 µl „first strand methyl nucleotide mix“ (je 10 mM dATP, dGTP und dTTP; 5 mM 5-methyl dCTP), 2 µl „linker primer“ (1,4 µg/µl) und 1 µl RNase Block Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl). Durch eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur konnten die „linker primer“ sich an die Poly(A)⁺ mRNS anlagern, ehe durch Zugabe von 1,5 µl MMLV-Reverser Transkriptase (50 U/µl) der Reaktionsansatz vervollständigt wurde. Für eine Kontrolle der Erststrangsynthese wurden 5 µl der Reaktion abgenommen und mit 0,5 µl [α -³²P]dATP (800 Ci/mmol) versetzt. Beide Reaktionen wurden bei 37°C für 1 h inkubiert und dann auf Eis gestellt. 2 µl der Kontrollreaktion wurden auf einem alkalischen Agarosegel (s. 2.2.6.2) aufgetrennt, um den Erfolg der Erststrangsynthese zu überprüfen.

Zweistrangsynthese

Zu den 45 µl der Erststrangreaktion wurden folgende Kitkomponenten zugegeben: 20 µl 10x „second strand buffer“, 6 µl „second strand dNTP mixture“ (je 10 mM dATP, dGTP und dTTP; 26 mM dCTP), 114 µl ddH₂O, 2 µl [α -³²P]dATP (800 Ci/mmol), 2 µl RNase H (1,5 U/µl) und 11 µl DNA-Polymerase I (9 U/µl). Nach 2 ½ h Synthese bei 16°C wurde die Reaktion sofort zum Abstoppen auf Eis gestellt.

Glätten der cDNS-Enden

Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 72°C nach Zugabe von 23 µl „blunting dNTP mix“ (je 10 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP) und 2 µl „cloned *Pfu* DNA Polymerase“ (2,5 U/µl). Der Ansatz wurde einmal mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1, v/v; pH 7,0-8,0) und ein weiteres mal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (s. 2.2.5.3). Die cDNS konnte dann mit NaAc/Ethanol ü.N. gefällt werden (s. 2.2.5.4).

Ligation der *Eco*R1-Adaptoren

Das cDNS-Sediment wurde zunächst in 9 µl *Eco* R1-Adaptoren (0,4 µg/µl) resuspendiert; 1 µl davon wurde zur Kontrolle der Zweitstrangsynthese abgenommen und auf einem alkalischen Agarosegel aufgetrennt (s. 2.2.6.2). Zu den verbleibenden 8 µl wurden 1 µl „10x buffer #3“, 1 µl rATP (10 mM) und 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl) zugegeben und der Ansatz ü.N. bei 8°C inkubiert. Das Abstoppen der Ligation erfolgte am nächsten Tag durch Inkubation bei 70°C für 30 min.

Phosphorylierung der *Eco*R1-Enden

Dem Ansatz wurden 1 µl „10x buffer #3“, 2 µl rATP (10 mM), 6 µl ddH₂O und 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) zugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte wieder durch Inkubation bei 70°C für 30 min.

*Xho*I Verdau

Dem wieder auf RT äquilibrierten Ansatz wurden 28 µl *Xho*I „buffer supplement“ und 3 µl *Xho*I (40 U/µl) zugegeben und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 48 µl 1x STE-Puffer wurde einmal mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1; pH 7,0-8,0) und ein weiteres mal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (s. 2.2.5.3). Erneut wurden 10 µl 1x STE zugesetzt, ehe die cDNS ü.N. mit 250 µl Ethanol bei -20°C gefällt wurde. Am nächsten Tag wurde 1 h mit 12.000 g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Sediment im

Rotationsverdampfer vollständig getrocknet und anschließend in 14 µl STE-Puffer und 3,5 µl „column loading dye“ wieder aufgenommen.

Größenfraktionierung der cDNS

Eine 1 ml Pipette wurde am unteren Ende mit einem Wattestopfen verschlossen und dann mit Sepharose CL-2B gefüllt. Nachdem sich das Gelbett gesetzt hatte konnte die Säule mit 10 ml 1x STE gewaschen werden. Vor dem Auslaufen der letzten 50 µl 1x STE wurde die Probe (*Xho*I Restriktionsansatz) auf das Gelbett geladen. Nach dem Einlaufen der Probe in das Gelbett konnten 3 ml 1xSTE zur Elution auf die Säule gegeben werden. Sobald die Farbe die –0,4 ml-Gradation erreicht hatte wurden 16 Fraktionen á 3 Tropfen (~100 µl) gesammelt. Durch eine Messung mit dem Handmonitor konnte die Elution von cDNS und nicht-eingebauten Nukleotiden überwacht werden. Von den Fraktionen wurden jeweils 8 µl abgenommen und auf einem 5 %igen (w/v) Acrylamid-Gel (s. 2.2.6.3) analysiert. Für die aufgrund der Gelanalyse ausgewählten Fraktionen folgte eine Extraktion mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1; pH 7,0-8,0) und ein weiteres mal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach einer ethanolischen Fällung ü.N. (s. 2.2.5.4) wurden die cDNS-Sedimente in jeweils 10 µl ddH₂O aufgenommen und die cDNS-Konzentration durch einen Ethidiumbromid-Test bestimmt (s. 2.2.5.6).

Ligation in den Uni-ZAP™ XR Vektor

Der 5 µl Ligationsansatz enthielt 100 ng der cDNS, 0,5 µl 10x Ligasepuffer, 0,5 µl rATP (10 mM, pH 7,5); 1,0 µl Uni-ZAP™ XR Vektor (1 µg/µl) und 0,5 µl T4 DNS-Ligase (4 U/µl). Die Reaktion wurde bei 12°C ü.N. inkubiert.

Verpackung in die Phagenhüllen

Zu einem „Gigapack® III Gold packaging extract“ wurde im angetauten Zustand der vollständige Ligationsansatz zugesetzt, vorsichtig eingerührt und dann 2 h bei 22°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform konnte die Phagensuspension dann titriert werden.

Bestimmung von Phagentiter und Rekombinationsrate

Von der Phagensuspension wurden 1 µl unverdünnt bzw. 1:10 in SM-Puffer verdünnt zu je 200 µl XL1-Blue MRF⁺ ($OD_{600}=0,5$; in 10 mM $MgSO_4$) gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde in 3 ml NZY Top-Agar (48°C), die mit 15 µl IPTG (0,5 M in ddH₂O) und 50 µl X-Gal (250 mg/ml in DMF) versetzt waren, gegeben und sofort auf eine NZY-Platte ausplattiert. Nach 6-8 h Inkubation bei 37°C konnten der Phagentiter anhand der gebildeten „plaque forming units“ (pfu) und die Rekombinationsrate anhand des Verhältnisses blauer zu weißer pfu bestimmt werden.

Amplifikation der cDNS-Bank

Die verbliebene Phagensuspension wurde auf kleinen NZY-Platten (Ø 9 cm) zu je 12.000-13.000 pfu ausplattiert und für 6-8 h bei 37°C inkubiert. Mit 5 ml SM-Puffer pro Platte konnten die Phagen dann bei 4°C ü.N. von den Platten gewaschen werden. Die 5 ml-Aliquots wurden vereinigt und zur Konservierung mit 0.3 % (v/v) Chloroform versetzt. Bei 4°C war so eine Lagerung für mehrere Monate möglich. Aliquots der Suspension wurden für eine Langzeitlagerung mit 7 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

2.2.10.2 Sichtung der cDNS-Bank durch „plaque“-Hybridisierung

Zur primären Sichtung wurden in quadratischen Platten (10 x 10 cm) mit NZY-Agar jeweils 20.000–27.000 pfu der Phagensuspension zusammen mit 600 µl XL1-Blue MRF⁺-Zellen ($OD_{600} = 0,5$ in 10 mM $MgSO_4$) ausplattiert. Nach Kultivierung ü.N. bei 37°C wurde am nächsten Tag eine Hybond-NTM (Amersham) bzw. Biotodyne ATM-Membran (PALL) für 2 min aufgelegt und anschließend 10 min mit der aufgelegten Seite nach oben auf ein mit Denaturierungspuffer getränktes Filterpapier (GB 002, Schleicher&Schüll, Dassel) gelegt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf einem mit Neutralisationspuffer getränkten Filterpapier, ehe die DNS durch „backen“ (80°C/2 h) auf der Membran fixiert wurde. Anschließend konnte die Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde erfolgen. Die Bereiche, die ein

Hybridisierungssignal zeigten, wurden aus der Platte ausgestochen und in SM-Puffer aufgenommen. Für die sekundäre Sichtung wurden hiervon jeweils 500-1000 pfu in runde Platten (\varnothing 9 cm) ausplattiert; für die tertiäre Sichtung je ~50 pfu.

2.2.10.3 *in vivo*-Exzision des pBluescript Phagemids

Der ausgewählte Phagenplaque wurde aus dem Agar ausgestochen und in ein Eppendorfgefäß mit 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform überführt. Durch heftiges Schütteln und nachfolgende Inkubation bei 4°C ü.N. konnten die Phagenpartikel in den Puffer freigesetzt werden. Eine XL1-Blue MRF⁺-Kultur wurde in LB-Medium bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,3-0,5$ kultiviert, bei 1.500 g für 1 min zentrifugiert, und zu einem OD_{600} von 1,0 in 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert. In einem 50 ml Röhrchen wurden daraufhin 200 μ l der XL1-Blue MRF⁺-Zellen, 250 μ l der Phagensuspension und 1 μ l ExAssistTM Helferphage vereinigt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium wurde noch 3 h bei 37°C geschüttelt, ehe die Kultur für 15 min auf 70°C erhitzt wurde und dann bei 4.000 g für 15 min zentrifugiert wurde. Der Überstand, der die filamentösen Phagenpartikel mit dem pBluescript Phagemid enthielt, wurde in ein Röhrchen überführt. In zwei Ansätzen wurde 100 bzw. 10 μ l des Überstands zu 200 μ l frisch in LB-Medium kultivierter SOLRTM-Zellen mit einem OD_{600} von 0,5–1,0 gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. 50 μ l von jedem Ansatz wurden auf LB-Amp. Agar-Platten (50 μ g/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten einzelne Kolonien gepickt werden, die Bakterien in LB-Amp. Medium kultiviert werden, um dann eine Plasmidisolierung (s. 2.2.5.2) durchzuführen.

2.2.10.4 Freisetzung der Phagen-DNS durch Proteolyse

2 ml Phagensuspension der cDNS-Bank wurden 5 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und zum Überstand wurden 200 μ l 0,5 mM EDTA (pH 8,0), 250 μ l 10% (w/v) SDS, 2,53 ml ddH₂O und 17,5 μ l Proteinase K (14,3 μ g/ μ l) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 56°C

wurde einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 7,5 – 8,0) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (siehe 2.2.5.3). Der klare Überstand wurde abgenommen und die DNS mit NaAc/EtOH für mehrere Stunden bei -20°C gefällt (s. 2.2.5.4). Das Sediment wurde schließlich in 100 μl TE-Puffer (10/1) resuspendiert.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde, sofern für die jeweilige Applikation nicht anders angegeben, nach Standardprotokoll (Innis *et al.*, 1990) durchgeführt. Ein Ansatz von 20 μl enthielt 400 ng Matrize (cDNS, Plasmid-DNS oder genomische DNS), 0,5 U *Taq*-Polymerase (Promega), 1,5 mM MgCl_2 ; 50 μM je Nukleotid, 5 μM je Oligonukleotid und 1x „*Taq* PCR Buffer“. Jeder PCR-Lauf startete mit einem 5 minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C . Dann folgten 30-40 Amplifikationszyklen. Die Anlagerung der Oligonukleotide erfolgte für 30 sec bei einer Temperatur, die 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur (T_m ; s. 2.2.7.8) des Oligonukleotids lag, oder bei einer in Vorversuchen optimierten Temperatur.

Die Polymerisation wurde bei 72°C durchgeführt, die Zeit richtete sich dabei nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der Aktivität der thermostabilen Polymerase (*Taq* Polymerase: ~ 75 Nukleotide/sec). Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 30 sec. Jeder PCR-Lauf endete mit einem 5 minütigen Polymerisationsschritt bei 72°C . Amplifiziert wurde in dem Thermocycler „PTC 100“ der Firma MJ-Research.

2.2.11.1 Design der Oligonukleotide

Die Oligonukleotid-Paare wurden mithilfe der Software „Primer 2“ (S&E Software, State Line, USA) ausgewählt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Vermeidung der Ausbildung von Oligonukleotiddimeren und Haarnadelstrukturen gelegt. Der „GC“-Gehalt wurde auf 50-60 % festgelegt. Bei

Oligonukleotidpaaren wurde auf möglichst gleiche Länge (19-23 Bp) und Schmelztemperatur geachtet.

2.2.11.2 Amplifikation von Matrizen mit starker Sekundärstruktur

Matrizen, die einen hohen „GC“-Gehalt aufwiesen und/oder starke Sekundärstrukturen ausbildeten wurden mit einem speziell angepaßten Protokoll amplifiziert. Dabei wurde ein 7-deaza-dGTP Nukleotid-Mix eingesetzt. Die Nukleotidkonzentrationen in der PCR betrugen dann: 200 µM dATP, 200 µM dTTP, 200 µM dCTP, 50 µM dGTP und 150 µM 7-deaza-dGTP). Zusätzlich wurden 2,5 % (v/v) DMSO zugesetzt.

2.2.11.3 Amplifikation mit Heißstart-Polymerasen

Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (GIBCO/BRL)

Ein 20 µl-Ansatz enthielt bis zu 1,6 µg Matrize (cDNS), 0,75 U *Pfx* DNA Polymerase, 1,0 mM MgSO₄; 50 µM je Nukleotid, 250 nM je Oligonukleotid, 1x –2x „PCRx Enhancer Solution“ und 1x „*Pfx* Amplification Buffer“. Das Amplifikationsprotokoll unterschied sich vom Standardprotokoll nur durch eine auf 68°C erniedrigte Polymerisationstemperatur.

AmpliTaq Gold™ (Perkin Elmer)

Ein 20 µl-Ansatz enthielt 0,4 µg Matrize (cDNS), 0,5 U AmpliTaq Gold™, 1,25 mM MgCl₂; 12,5-20 µM je Nukleotid, 2,5 µM je Oligonukleotid und 1x „PCR Buffer II“. Zur Amplifikation wurden 2 unterschiedliche Protokolltypen verwendet: bei der Heisstart Technik wurde durch einen 10 minütigen 95°C-Schritt, der dem PCR-Lauf vorangestellt ist, sämtliches Enzym gleichzeitig aktiviert und stand so für eine spezifische Amplifikation ab dem ersten Zyklus zur Verfügung. Bei der „Time Release“ Technik wurde ein Standard PCR-Protokoll verwendet, sodaß das Enzym sukzessive bei jedem 95°C-Schritt aktiviert wurde; diese Technik führt neben einer erhöhten Spezifität vor allem zu einer höheren Ausbeute.

2.2.11.4 „touchdown“-PCR

Die „touchdown“-PCR führt zu einer begünstigten Amplifikation des spezifischen Produkts. Dies wird dadurch erreicht, daß mit einer Anlagerungstemperatur begonnen wird, die etwas über der Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide liegt. In einer ersten Folge von Amplifikationszyklen wird die Anlagerungstemperatur dann bei jedem Zyklus um 0,5-1,0°C erniedrigt. Wenn die Anlagerungstemperatur erreicht ist, bei der eine effektive Vervielfältigung des Amplikons erfolgen kann, wird mit der gewünschten Zyklenzahl nach dem jeweiligen Protokoll amplifiziert.

2.2.11.5 ³²P-markierte PCR-Produkte

Zur radioaktiven Markierung von PCR-Produkten wurden zu einem 20 µl PCR-Ansatz 0,1 µl [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) zugesetzt.

2.2.11.6 Amplifikation von RNS-Matrizen mittels RT-PCR

2.2.11.6.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription verlief gemäß dem Protokoll von Promega (Protocols and Applications Guide, 1996). Dazu wurden 0,1 - 2,0 µg RNS zusammen mit 50 pmol reversem Oligonukleotid in einem Volumen von 13,7 µl für 5 min bei 70°C inkubiert und dann 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 20 nmol dNTPs, 1x RT-Puffer, 12,5 U RNase-Inhibitor, 200 U MMLV-RT, RNase H⁻ (Promega) und ddH₂O *ad* 20 µl wurde die Reaktion 1 h bei 37°C inkubiert und durch Erhitzen auf 95°C für 5 min gestoppt. Von diesem Ansatz wurden 2 µl als Matrize in die PCR eingesetzt. Nukleotide und reverses Oligonukleotid mußten dann nicht mehr zugegeben werden.

2.2.11.6.2 RT-PCR mit dem „Titan™ One TubeRT-PCR System“ (Boehringer)

Der 50 µl RT-PCR Ansatz enthielt 0,5-1,0 µg RNS, 1,0 µl Enzym-Mix, 200 µM je Nukleotid, 0,4 µM je Oligonukleotid, 8 U RNasin, 5 mM DTT und 1x RT-Puffer. Die reverseTranskription wurde für 30 min bei 50°C durchgeführt. Die anschließende Amplifikation erfolgte nach Standardprotokoll mit einer auf 68°C erniedrigten Polymerisationstemperatur.

2.2.12 Klonierung von PCR-Fragmenten

2.2.12.1 Reinigung des Amplifikats

Nach erfolgter Amplifikation wurde der PCR-Ansatz (20-200 µl) mit dem „QIAquick™ PCR Purification Kit“ (Qiagen) von Salzen sowie von nicht-eingebauten Nukleotiden und Oligonukleotiden befreit. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit fünf Volumen Puffer PB versetzt, auf eine „QIAquick spin column“ gegeben und diese für 60 s bei 12.000 g und RT zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule wurde durch Zugabe von 750 µl Puffer PE gefolgt von einer Zentrifugation bei 12.000 g bei RT für 60 s gewaschen. Zur Elution der DNS wurden 50 µl Puffer EB auf die Säule gegeben und es wurde erneut 60 s bei 12.000 g und RT zentrifugiert. Die eluierte DNS konnte direkt für die nachfolgenden Klonierungsschritte eingesetzt werden.

2.2.12.2 Glätten der DNS-Enden mit dem Klenow-Enzym

Zu 16,5 µl DNS (100-500 ng) wurden 2 µl Klenow-Puffer (10x), 1 µl dNTPs (jeweils 1 mM) und 0,5 µl Klenow-Enzym (5 U/µl, NEB) gegeben. Die Reaktion wurde 30 min bei RT inkubiert und dann direkt durch eine Fällung mit NaAc/Ethanol (s. 2.2.5.4) bei -20°C abgestoppt.

2.2.12.3 Dephosphorylierung von DNS-Enden

Um eine Religation von besonders langen Fragmenten, die an beiden Enden die gleiche Restriktionsschnittstelle trugen, zu vermeiden, erfolgte in einigen Fällen eine Dephosphorylierung dieser Enden. Hierzu wurde 1 µg DNS in einem 40 µl-Ansatz mit 1x Puffer (NEB 3, NEB) und 10 U Alkalische-Phosphatase (NEB) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde einmal mit 40 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit 40 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (s. 2.2.5.3). Die DNS im Überstand konnte daraufhin mit NaAc/Ethanol bei -20°C ü.N. gefällt werden (s. 2.2.5.4).

2.2.12.4 Elution von PCR-Fragmenten aus einem Agarosegel

Der Reaktionsansatz wurde auf ein 0,8-1,5 %iges (w/v) Agarosegel in TA-Puffer aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (s. 2.2.6.1). Das Gelstück mit der relevanten Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und auf eine „Gen Elute AGAROSE SPIN COLUMN“ (Sigma) gegeben, die zuvor mit 100 µl 10/1 TE-Puffer equilibriert worden war. Durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 12.000 g konnte der TA-Puffer mit der gelösten DNS im Eppendorfgefäß aufgefangen werden. Zur Aufkonzentrierung der DNS erfolgte im Anschluß eine Fällung mit NaAc/EtOH bei -20°C (s. 2.2.5.4).

2.2.12.5 Ligation von DNS in einen linearisierten Vektor

Für die Ligation wurde ein molares Vektor/DNS-Fragment Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gewählt. 150 ng des mit dem jeweiligen Enzym geschnittenen Vektor wurden mit der entsprechenden Menge eines DNS-Fragments, 1x Ligase-Puffer und 1 U T4-Ligase (Boehringer) in einem 10 µl-Ansatz ü.N. bei RT ligiert. Nach erfolgter Reaktion konnte der Ansatz direkt für die Transformation in *E. coli* XL1-Blue (s. 2.2.5.9) verwendet werden.

2.2.13 Untersuchungen zu RNS/Proteinwechselwirkungen

2.2.13.1 RNS-Synthese

Die Herstellung von RNS erfolgte über eine *in vitro*-Transkription. Dazu wurde das Plasmid durch einen Restriktionsschnitt am 3'-Ende des klonierten-Fragments in der „multiple cloning site“ des Vektors linearisiert (s. 2.2.5.7.2). Als Startpunkt für die Transkription diente der T3- bzw. T7-Promotor, der Endpunkt war durch die Lage der Schnittstelle vorgegeben.

2.2.13.1.1 Synthese größerer Mengen unmarkierter RNS

Die Transkription wurde mit einem variierten Protokoll des „Riboprobe®*in vitro*-Transkription System“ (Promega) bzw. mit dem „T7-MEGAscript™“- und „T7-MEGAscript™-Kit“ (Ambion) durchgeführt.

Variiertes Protokoll des „Riboprobe®*in vitro* Transkription System“

Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt 1x TSC-Puffer (Promega), 10 mM DTT, 20-40 U RNase-Inhibitor (25-40 U/µl, MBI oder Promega), 500 µM je NTP, 0,2-1,0 µg linearisiertes Plasmid und 20 U T3 bzw. T7-Polymerase (20 U/µl, Boehringer). Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und dann einmal mit Phenol/Chloroform (25:24) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (s. 2.2.5.3). Anschließend folgte eine NaAc/EtOH-Fällung ü.N. (s. 2.2.5.5). Das RNS Sediment wurde in DEPC-behandeltem ddH₂O zur gewünschten Konzentration aufgenommen. Zur Ausbildung der jeweiligen Sekundärstruktur wurde das Transkript für 5 min auf 75°C erhitzt und dann über 2 h langsam auf RT abgekühlt.

„T7-MEGAscript™“- und „T7-MEGAscript™-Kit“

Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt 1x „Transcription Buffer“, 7,5 mM (MEGAscript) bzw. 10 mM (MEGAscript) je NTP, 1-4 µg linearisiertes Plasmid und 2 µl „Enzyme Mix“. Der Reaktionsansatz wurde 1-4 h bei 37°C inkubiert und dann einmal mit Phenol/Chloroform (25:24) und einmal mit

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (s. 2.2.5.3). Anschließend folgte eine NaAc/EtOH-Fällung ü.N. (s. 2.2.5.5). Das RNS Sediment wurde in DEPC-behandeltem ddH₂O zur gewünschten Konzentration aufgenommen. Zur Ausbildung der jeweiligen Sekundärstruktur wurde das Transkript für 5 min auf 75°C erhitzt und dann über 2 h langsam auf RT abgekühlt.

2.2.13.1.2 Synthese des ³²P-markierten RNS-Transkripts

Die Transkription wurde nach einem speziell ausgearbeiteten Protokoll durchgeführt. Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt 4 µl 10x TSC-Puffer (Promega), 2 µl DTT (100 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (25-40 U/µl, MBI oder Promega), 4 µl NTP-Mix (ATP, CTP und GTP je 2,5 mM), 1 µl UTP (25 µM), ~1 µg linearisiertes Plasmid, 6,8 µl [α -³²P]UTP (3000 Ci/mmol) und 1 µl T3 bzw. T7-Polymerase (20 U/µl, Boehringer). Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit NH₄Ac/EtOH bei -20°C ü.N. gefällt (s. 2.2.5.5).

2.2.13.1.3 Aufreinigung des ³²P-markierten RNS-Transkripts

Die Aufreinigung des Transkripts erfolgte über ein 5 %iges (w/v) denaturierendes Polyacrylamidgel (s. 2.2.6.7). Das gefällte RNS-Transkript wurde in 10 µl ddH₂O und 10 µl RNS-Probenpuffer I aufgenommen und 5 min bei ~75°C denaturiert. Nachdem das Gel bei 200 V für 20 min vorgelaufen war, wurde die Probe aufgetragen und bei 150 V soweit aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande ca. 2/3 der Länge des Gels durchlaufen hatte. Durch Belichtung eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP, Amersham), der passgenau auf das Gel aufgelegt wurde, konnte die Position des spezifischen RNS-Transkripts im Gel bestimmt werden. Das entsprechende Gelstück wurde ausgeschnitten, in 500 µl Elutionspuffer gegeben und die RNS durch Inkubation bei 42°C in 3-4 h eluiert. Nachdem die RNS mit 2 Vol Ethanol ü.N. bei -20°C gefällt worden war (s. 2.2.5.5), wurde das zentrifugierte und getrocknete Sediment in soviel ddH₂O aufgenommen, daß mit dem Handmonitor eine Aktivität von ~400 cps/µl zu messen war. Zur Ausbildung der jeweiligen Sekundärstruktur wurde das RNS-Transkript vor Gebrauch 5 min auf 75°C erhitzt und dann über ca. 2 h langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.2.13.1.4 Das „mobility shift“-Experiment (Mittag *et al.*, 1994)

Bei RT wurden 28 µg Proteinrohextrakt (s. 2.2.4) und 28 µg poly(G) (Sigma) vereinigt und mit Aufschlußpuffer (+80 U/ml RNase-Inhibitor, MBI oder Promega) auf ein Volumen von 15 µl gebracht. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, um unspezifisch an RNS bindende Proteine durch den unspezifischen Kompetitor poly(G) abzufangen. Dann wurden 150 cps (max. 1,5 µl) des ³²P-markierten Transkripts zugegeben und es wurde wiederum für 20 min bei RT inkubiert. Sollte eine spezifische Kompetition durchgeführt werden, wurde unmarkiertes Transkript, im vorher festgelegten stöchiometrischen Verhältnis, unmittelbar vor dem markierten Transkript zugegeben. Nach Zugabe von 1 µl RNS-Probenpuffer II konnte der Ansatz auf ein natives Polyacrylamidgel (s. 2.2.6.8) aufgetragen und ca. 3 ½ h bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit dem Auslaufen der Bromphenolblau-Bande wurde der Lauf gestoppt, das Gel auf Filterpapier (GB 002, Schleicher&Schüll, Dassel) transferiert und bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.2.13.1.5 Das „UV-crosslink“-Experiment (Waltenberger *et al.*, 2001)

Bei RT wurden 56 µg Proteinrohextrakt (s. 2.2.4) und 56 µg poly(G) (Sigma) vereinigt und mit Aufschlußpuffer (+80 U/ml RNase-Inhibitor, MBI oder Promega) auf ein Volumen von 22 µl gebracht. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, um unspezifisch an RNS bindende Proteine durch den unspezifischen Kompetitor poly(G) abzufangen. Dann wurden 1000 cps (max. 2 µl) des markierten Transkripts zugegeben und es wurde wiederum für 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde zu gleichen Teilen (2 x 12 µl) in 2 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben, die Platte auf Eis gestellt und von oben in einem Abstand von 0,5 cm für 30 min mit starkem UV-Licht (256 nm, 2000 W/cm²) bestrahlt. Die beiden Ansätze wurden wieder vereinigt und die RNS durch Zugabe von 4 µl RNase A (10 µg/µl) und 2 µl RNase T1 (~1200 U/µl) in einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C verdaut. Nach Zugabe von 1 Vol Probenpuffer und Denaturierung für 5 min bei 100°C konnte die Probe auf einem 12,5 %igen (w/v)

SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.2.6.7) bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit dem Auslaufen der Bromphenolblau-Bande wurde der Lauf gestoppt und das Gel auf Filterpapier (GB 002, Schleicher&Schüll, Dassel) transferiert und bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.2.14 Autoradiographie und Quantifizierung radioaktiver Banden

Nach dem Trocknen der Gele auf einem Vakuumtrockner wurden diese gegen eine „Image plate“ (Fuji Bas-MP 2025P) exponiert und dann mit dem „Image plate reader“ (Fujifilm Bas 1500) ausgewertet. Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte mithilfe der „Tina 2.09g-Software“ (Raytest, Straubenhardt). Ferner wurden mit den Gelen ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham [Braunschweig]) exponiert. Die entwickelten Filme wurden im Durchlicht mittels eines „Scanners“ digitalisiert.

2.2.15 Statistische Auswertung

2.2.15.1 Auswertung der semiquantitativen RT-PCR

Um die Signalstärken aus den unterschiedlichen Meßreihen miteinander verrechnen zu können, wurde aus jeder LD- bzw. LL-Reihe das arithmetische Mittel der Signalstärken gleich „1“ gesetzt. Dadurch war es möglich die Kurven einer LD- bzw. LL-Reihe übereinander zu legen und für jeden Zeitpunkt einen Mittelwert (= relative Signalstärke) zu berechnen.

2.2.15.2 Berechnung des Standardfehlers (S_A)

Der Standardfehler für mehrere Messungen berechnete sich nach:

$$S_A = \frac{\sqrt{\frac{\sum(A - y_i)^2}{n - 1}}}{\sqrt{n}}$$

A = arithmetisches Mittel; y_i = alle einzelnen Meßwerte; n = Anzahl der Werte

2.2.16 ASL-Enzymtest (modifiziert nach: Loppes *et al.*, 1972; van Pilsum *et al.*, 1955)

Im ASL-Enzymtest wird im ersten Schritt Argininosuccinat durch das Enzym zu Arginin und Succinat umgesetzt. In der Nachweisreaktion wird dann das gebildete Arginin zu einem Farbstoff umgewandelt, der photometrisch quantifizierbar ist.

Die Komponenten der Enzymreaktion wurden bei 4°C vereinigt. Der 500 µl Ansatz enthielt 25 µg Proteinrohextrakt (s. 2.2.4.2), 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) und 1,32 mM Argininosuccinat (Di-Natriumsalz). Mit Zugabe des Argininosuccinats und sofortiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion gestartet. Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl TCA (10 % (w/v)) gestoppt. Nach einer 10 minütigen Fällung der Proteine bei 4°C wurde zentrifugiert (12.000 g, 10 min, 4°C) und 900 µl des klaren Überstands konnten für die Arginin-Bestimmung abgenommen werden.

Der Arginin-Nachweis erfolgte durch die „Sakaguchi-Reaktion“ (Van Pilsum *et al.*, 1955), wobei ein roter Farbstoff (Abb. 8) gebildet wurde.

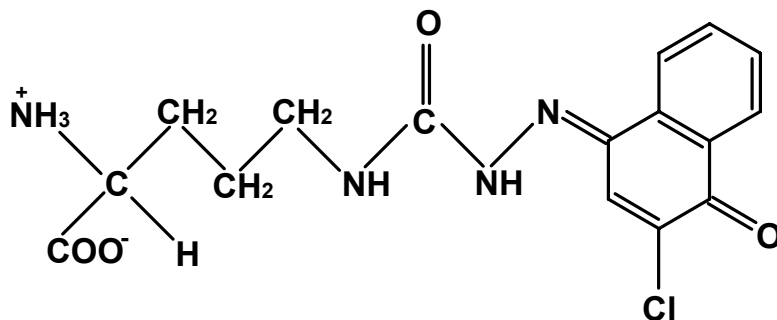


Abb. 8: Endprodukt der „Sakaguchi-Reaktion“

Arginin bildet mit α -Naphthol bei Anwesenheit von Hypochlorid einen roten Farbstoff (Lübke *et al.*, 1975).

Die Komponenten der Nachweisreaktion wurden bei 4°C vereinigt. Zu 900 μ l Überstand gab man 250 μ l α -Naphthol/Thymin-Lsg. (0,04 % [w/v] α -Naphthol in Ethanol, 2 % [w/v] Thymin in NaOH [10 % [w/v]]) und 100 μ l Natriumhypochlorid-Lösung (1 % [w/v]) und mischte nach jeder Zugabe sofort gründlich. Die Reaktion wurde exakt 1 min bei 4°C inkubiert und dann durch Zugabe von 100 μ l Natriumthiosulfat (2 % [w/v]) gestoppt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C konnte die Absorption bei 514 nm gemessen werden. Als Referenz diente ein Reaktionsansatz bei dem die Argininosuccinat-Lösung durch ddH₂O ersetzt worden war.

Obigem Schema folgend wurde mit Arginin-Standards in 50 mM Phosphatpuffer eine Eichkurve erstellt über die sich die Enzymaktivität in μ mol Arginin/h x mg Protein (bei 37°C) graphisch ermitteln ließ.

Bestimmung der Arginase-Aktivität:

Zur Bestimmung der Arginase-Aktivität wurde ein Reaktionsansatz ohne Argininosuccinat (=Referenz der ASL-Enzymreaktion) gegen einen Reaktionsansatz ohne Argininosuccinat und ohne 37°C-Inkubation als Referenz gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Bindestelle für CHLAMY 1 und den CCTR

Es war gezeigt worden, daß das circadiane RNS-Bindeprotein CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* spezifisch an eine 22 Nukleotide lange Region im 3'-UTR der *lbp*-mRNS aus *G. polyedra* bindet, die 7 „UG“-Elemente enthält (Mittag, 1996). Um auch in *C. reinhardtii* mRNS zu finden, an die CHLAMY 1 spezifisch bindet, war es zunächst notwendig das zentrale Bindemotiv für CHLAMY 1 genauer zu charakterisieren. Insbesondere war es wichtig zu ermitteln, wieviele „UG“-Wiederholungen für eine hohe Bindeaktivität von CHLAMY 1 nötig sind und welche Bedeutung die die „UG“-Repetition flankierenden Nukleotide für die Bindung haben. Zu diesem Zweck sollten durch gezielte *in vitro*-Mutagenesen relevante Nukleotide der 22 Nukleotide langen Region des *lbp* 3'-UTR ausgetauscht werden, um dann die verbleibende Bindeaktivität von CHLAMY 1 und dem CCTR zu testen.

3.1.1 *In vitro*-Mutagenese des *lbp* 3'-UTRs (Mittag und Waltenberger, 1997)

Die *in vitro*-Mutagenesen wurden mit dem „U.S.E. Mutagenesis Kit“ (Pharmacia) durchgeführt (s. 2.2.9). Ausgehend vom Plasmid pMM3 (Abb. 3), das ein Fragment des *lbp* 3'-Ende enthält, wurden nach der Methode von Deng & Nickoloff (1992) neun mutierte Varianten des *lbp* 3'-UTR hergestellt (Abb. 9). Zunächst wurden Nukleotide, die die „UG“-Repetition „upstream“ (GCTT zu TGCA, pHW5) und „downstream“ (CAG zu TAC, pHW3) flankieren, ausgetauscht (Abb. 9). Dann wurden sukzessive ein bis drei „UG“-Elemente ersetzt (pHW7, pHW8, pHW6 bzw. pHW9, pHW10, pHW11); dies erfolgte von beiden Seiten der „UG“-Repetition, da die Region aufgrund des zusätzlichen „UUG“ an Position 5 asymmetrisch ist. Zuletzt wurden die zentralen fünf „UG“-Elemente einschließlich dem „UUG“-Element ausgetauscht (pHW2). Bei der

Mutation der „UG“-Elemente wurde in erster Linie darauf Wert gelegt die „UG“-Repetition zu unterbrechen, ohne dabei auch notwendigerweise beide Nukleotide eines „UG“-Elements auszutauschen.

												% Bindeaktivität	
												CCTR	Chlamy1
		I	II	III	IV	V	VI	VII					
pMM3/wt	5`	GCTT	TG	TG	TG	TG	TTG	TG	TG	CAG	3`	100	100
pHW5	5`	TGCA	--	--	--	--	---	--	--	---	3`	48	48
pHW3	5`	----	--	--	--	--	---	--	--	T-C	3`	36	20
pHW7	5`	----	--	--	--	--	---	--	AT	---	3`	13	49
pHW9	5`	----	A-	--	--	--	---	--	--	---	3`	67	35
pHW8	5`	----	--	--	--	--	---	GA	-C	---	3`	12	6
pHW10	5`	----	GT	AC	--	--	---	--	--	---	3`	0	0
pHW6	5`	----	--	--	--	--	GAT	AT	CA	---	3`	0	0
pHW11	5`	----	G-	AT	CC	--	---	--	--	---	3`	0	0
pHW2	5`	----	--	A-	GA	-C	CAC	AC	--	---	3`	0	0

Abb. 9: *In vitro*-Mutagenese der 22 Nukleotide langen Region im *lbp* 3'-UTR

Die *in vitro*-Mutagenese wurde nach der Methode von Deng & Nickoloff (1992) durchgeführt. Ausgegangen wurde vom Plasmid MM3, das das *lbp* 3'-Ende aus *G. polyedra* enthält. Zu Beginn jeder Zeile ist das Plasmid genannt, das die jeweilige Mutation trägt. In der obersten Zeile ist die Wildtyp-Sequenz (wt) wiedergegeben; die sieben „UG“-Elemente einschließlich des „UUG“ an der fünften Position sind mit I–VII bezeichnet. Die Bindeaktivität des CCTR bzw. von CHLAMY 1 an die Wildtyp-Sequenz wurde als 100 % definiert.

Die Mutagenese-Oligonukleotide waren so konzipiert worden, daß sie neben der beabsichtigten Mutation auch eine neue Restriktionsschnittstelle in das Plasmid einführen. Der Erfolg der Mutagenese konnte somit durch einen Verdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym kontrolliert werden. Tab. 1 zeigt, welche Schnittstelle jeweils neu eingeführt wurde und welche Restriktionsfragmente durch einen Verdau zu erwarten waren. Fragmente, die für das mutierte Plasmid charakteristisch sind, sind durch fette Zahlen markiert.

Tab. 1: Eingeführte Restriktionsschnittstellen zur Überprüfung der mutierten Varianten von pMM3.

Jedes Oligonukleotid führt in das Plasmid pMM3 neben der beabsichtigten Basenaustausche auch eine neue Restriktionsschnittstelle, sodaß durch den entsprechenden Restriktionsverdau der Erfolg der Mutagenese überprüft werden kann.

Oligonukleotid/ Resultierendes Plasmid	Schnittstelle	Restriktionsfragmente (Größe in Bp)
OMM27/ pHW5	<i>NsiI</i>	3050
OMM28/ pHW2	<i>BamHI</i>	3050
OMM29/ pHW3	<i>RsaI</i>	1896, 1154
OMM30/ pHW7	<i>BclI</i>	3050
OMM31/ pHW8	<i>BamHI</i>	3050
OMM32/ pHW6	<i>EcoRV</i>	3050
OMM34/ pHW9	<i>DdeI</i>	1150, 703, 540, 409, 166, 82
OMM35/ pHW10	<i>RsaI</i>	1881, 1169
OMM36/ pHW11	<i>BamHI</i>	3050

Die Restriktionsanalyse der mutierten Plasmide zeigt (Abb. 10), daß die Plasmide pHW2, pHW5, pHW6, pHW7 und pHW11 wie erwartet durch das jeweilige Restriktionsenzym linearisiert wurden, während das Ausgangsplasmid pMM3 unverdaut (zirkulär) blieb. Bei pHW3, pHW9 und pHW10 ließen sich nur Restriktionsschnittstellen für Enzyme einfügen, die bereits im Vektoranteil des Plasmids schnitten. Durch die neu eingeführte Schnittstelle entstanden in diesen Fällen also mehrere Restriktionsfragmente. Auch diese mutierten Plasmide zeigten das erwartete Restriktionsmuster. Somit war also sichergestellt, daß alle neun Plasmide die beabsichtigten Basenaustausche enthielten.

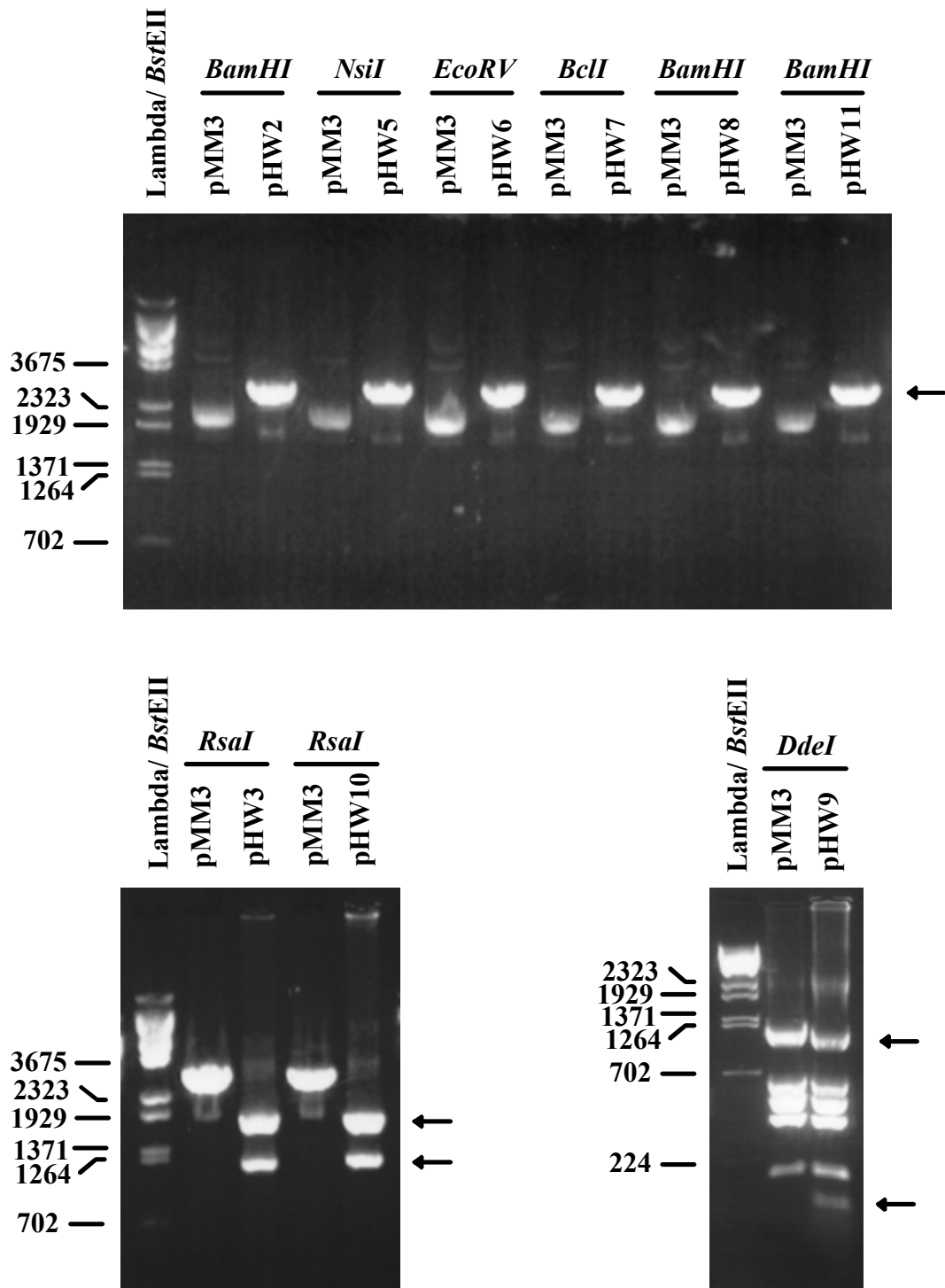


Abb. 10: Überprüfung der mutierten Varianten von pMM3 durch Restriktionsverdau

Bei jeder mutierten Variante von pMM3 wurde eine neue Restriktionsschnittstelle eingeführt, sodaß der Erfolg der Mutation durch einen Verdau mit dem jeweiligen Enzym kontrolliert werden konnte. Zur Verdeutlichung wurden jeweils das pMM3 und die mutierte Variante mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Fragmente, die durch die eingeführte Schnittstelle erzeugt wurden, sind durch einen Pfeil markiert.

3.1.2 Charakterisierung der mutierten Sequenzen im „mobility shift“-Experiment

Die Bindung eines Proteins an eine RNS kann mit einem „mobility shift“-Experiment untersucht werden. Dazu wird das Transkript mit ^{32}P markiert und dann mit einem Proteinrohextrakt der jeweiligen Zellen inkubiert. RNS und Protein können so aneinander binden. Um unspezifisch bindende Proteine abzufangen, wird dem Reaktionsansatz poly(G) als unspezifischer Kompetitor zugesetzt. In einem nativen Proteingel aufgetrennt, läuft die RNS, die ein gebundenes Protein trägt, langsamer als die freie RNS - der RNS/Proteinkomplex wird retardiert. Durch die radioaktive Markierung der RNS wird der Protein/RNSkomplex („shift“) im Autoradiogramm sichtbar.

Von den neun mutierten Varianten des *lbp* 3'-UTR wurden radioaktiv markierte RNS-Transkripte synthetisiert. Dazu wurde das jeweilige Plasmid zunächst durch einen Restriktionsverdau hinter dem inserierten Fragment linearisiert (s. 2.2.5.7.2). Vom T7-Promotor, der vor dem inserierten Fragment lag, konnte dann in einer *in vitro*-Transkription unter Zugabe von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ die RNS synthetisiert werden (s. 2.2.13.1.2), das Ende der Polymerisation war durch die Restriktionsschnittstelle vorgegeben. Nach Reinigung des spezifischen Transkripts über ein Polyacrylamidgel (s. 2.2.13.1.3) wurde es dann im „mobility shift“-Experiment (s. 2.2.13.1.4) mit einem Proteinrohextrakt (s. 2.2.4.1) aus *C. reinhardtii* (Stamm 137c) getestet. Zusätzlich wurden die Transkripte auch mit einem *G. polyedra* Proteinrohextrakt (s. 2.2.3) auf eine Bindung des CCTR untersucht. Die Ernte der Zellen erfolgte jeweils zu dem Zeitpunkt an dem die Bindeaktivität von CHLAMY 1 bzw. dem CCTR hoch ist (LD13 für CHLAMY 1; LD3 für den CCTR). Um eine Quantifizierung der Bindeaktivität von CHLAMY 1 an ein mutagenisiertes Transkript vornehmen zu können, wurde bei jedem Experiment zum Vergleich auch das Wildtyp-Transkript (pMM3) getestet (Abb. 9 u. Abb. 11).

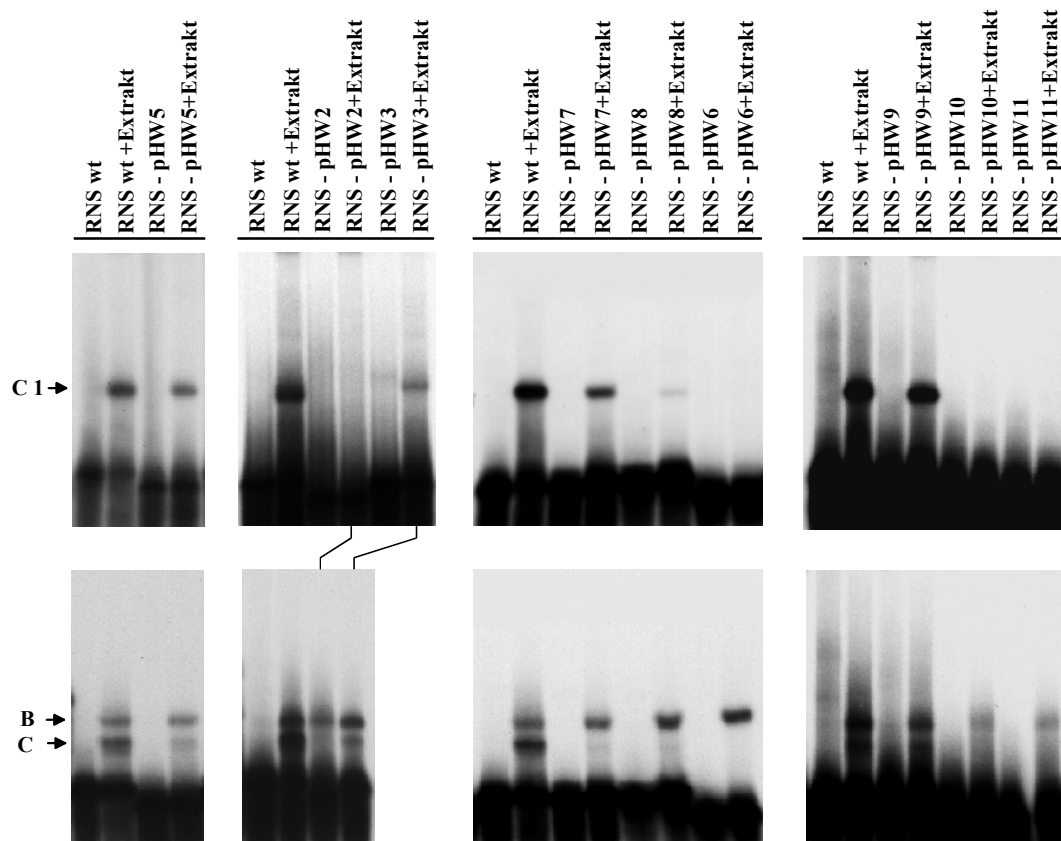


Abb. 11: Autoradiogramme von „mobility shift“-Experimenten mit *C. reinhardtii* und *G. polyedra* Proteinrohextrakten zusammen mit dem *lbp* 3'-UTR-Transkript und seinen mutierten Versionen

Spuren, die die Mobilität des Transkripts allein zeigen, sind mit „RNS wt“, etc. gekennzeichnet. Spuren, die die Mobilität des Transkripts nach Inkubation mit poly(G) und dem Rohextrakt zeigen sind mit „RNS“ wt + Extrakt, etc. gekennzeichnet. In der oberen Reihe werden „mobility shift“-Experimente mit *C. reinhardtii* Rohextrakt, in der unteren Reihe mit *G. polyedra* Rohextrakt gezeigt. C1 steht für CHLAMY 1, C für den CCTR und B für einen „shift“, der durch ein unspezifisch an die RNS bindendes Protein aus *G. polyedra* verursacht wird. Die Bilder zeigen nur den unteren Teil der jeweiligen Gele.

Bei Transkripten mit einem Austausch der Nukleotide, die die „UG“-Repetition „upstream“ (pHW5) und „downstream“ (pHW3) flankieren, reduzierte sich die Bindeaktivität von CHLAMY 1 und dem CCTR auf unter 50 %, verglichen mit dem Wildtyp-Transkript (Abb. 9 u. Abb. 11). Ebenso führte die Mutation eines „UG“-Elements an beiden Seiten der Repetition (pHW7 und pHW9) zu einer deutlich verringerten Bindung (13 bzw. 67 % beim CCTR und 49 bzw. 35 % bei CHLAMY 1). Der Austausch von zwei „UG“-Elementen am 3'-Ende der Repetition (pHW8) ermöglichte eine noch geringe Bindung (12 % beim CCTR

und 6 % bei CHLAMY 1), während beim Austausch am 5'-Ende (pHW10) die Bindung von CHLAMY 1 und dem CCTR gänzlich verloren ging. Wurden drei „UG“-Elemente von einer Seite eliminiert (pHW6 und pHW11), konnte keine Bindeaktivität mehr nachgewiesen werden. Ebenso führte eine Mutation der zentralen fünf „UG“-Elemente (pHW2) zu einem vollständigen Verlust der Bindung.

Die Ergebnisse zeigten, daß sowohl für CHLAMY 1, als auch für den CCTR, die „UG“-Repetition das zentrale Element des Bindemotivs darstellt; maximale Bindeaktivität wurde jedoch nur zusammen mit den flankierenden Regionen erreicht. Mutationen innerhalb der „UG“-Repetition führten, je nach Ausmaß, zu einem deutlichen bis vollständigem Verlust der Bindung beider Proteine. Für eine signifikante Bindung von CHLAMY 1 und dem CCTR sind daher mindestens sechs „UG“-Elemente in Folge notwendig.

3.2 Synthese einer cDNS-Bank aus *C. reinhardtii*

Es war gezeigt worden, daß das Protein CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* spezifisch und circadian kontrolliert an die „U(U)G“-Wiederholung im 3'-UTR der *lbp*-mRNS aus *G. polyedra* bindet. Aus *C. reinhardtii* selbst waren jedoch noch keine mRNS-Moleküle bekannt, die dieses Motiv in ihrem 3'-UTR tragen und somit potentielle Ziele für eine Bindung von CHLAMY 1 darstellen (April 1997). Um entsprechende mRNS-Moleküle zu finden, sollte zunächst eine cDNS-Bank aus *C. reinhardtii* angelegt werden, die dann mit einer Sonde gegen die „U(U)G“-Wiederholung gesichtet werden konnte.

Da die Bindung von CHLAMY 1 an den *lbp* 3'-UTR am Ende des Tages ihr Maximum erreicht (Mittag, 1996), konnte davon ausgegangen werden, daß RNS-Transkripte mit dem Bindemotiv für CHLAMY 1 zu diesem Zeitpunkt auch exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde für die Synthese der cDNS-Bank Poly(A)⁺RNS aus Zellen, die zum Zeitpunkt LD10 geerntet worden waren, verwendet.

3.2.1 cDNS-Synthese

Aus einer *C. reinhardtii*-Kultur (137c) wurde mit der Guanidinthiocyanat-Methode (s. 2.2.7.2) zunächst Gesamt-RNS isoliert. Ein Aliquot davon wurde zur Kontrolle im „Northern“-Transfer (s. 2.2.6.4 u. 2.2.6.5) mit anschließender Methylenblau-Färbung (s. 2.2.6.6) analysiert. Zur Beurteilung der Qualität einer RNS kann die relative Intensität der ribosomalen RNS (rRNS) herangezogen werden. Wie Abb. 12 zeigt, waren die 28S und 18S rRNS als distinkte Banden zu erkennen, kleinere Abbauprodukte tauchten nicht auf. Die RNS war somit undegradiert und für die Synthese einer qualitativ hochwertigen cDNS-Bank geeignet.

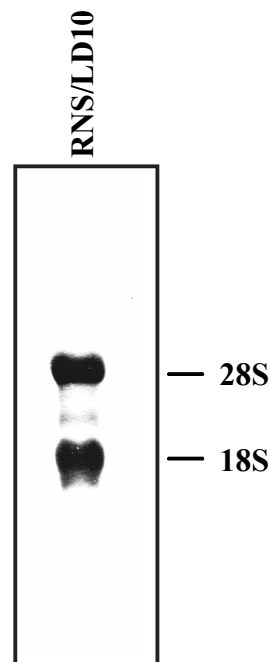


Abb. 12: „Northern“-Analyse der Gesamt-RNS

20 µg Gesamt-RNS wurden auf einem 1 %igen Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt (80 V, 1 ½ h), auf eine HybondN-Membran geblottet und mit Methylenblau angefärbt (s. 2.2.6.6).

Im nächsten Schritt wurde dann die Poly(A)⁺-Fraktion mithilfe des „PolyA Tract® mRNA Isolation System“ (Promega) (s. 2.2.7.3) isoliert. 5 µg der Poly(A)⁺RNS wurden zur Synthese der cDNS mit dem „ZAP-cDNA® Synthesis Kit“ (Stratagene) eingesetzt (s. 2.2.10.1). Um den Verlauf der Reaktion

kontrollieren zu können, wurden in den Erst- und Zweitstrang der cDNS geringe Mengen [α - 32 P]dCTP eingebaut. Die Analyse von Aliquots beider Reaktionen in einem alkalischen Agarosegel (s. 2.2.6.2) zeigte cDNS Fragmente bis zu mehreren Kilobasen Größe (Abb. 13). Distinkte Banden, die ein Anzeichen für starke Sekundärstrukturen sind, tauchten nicht auf. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß auch lange mRNS-Moleküle vollständig transkribiert worden waren und es nicht aufgrund starker Sekundärstrukturen zu Strangabbrüchen gekommen war.

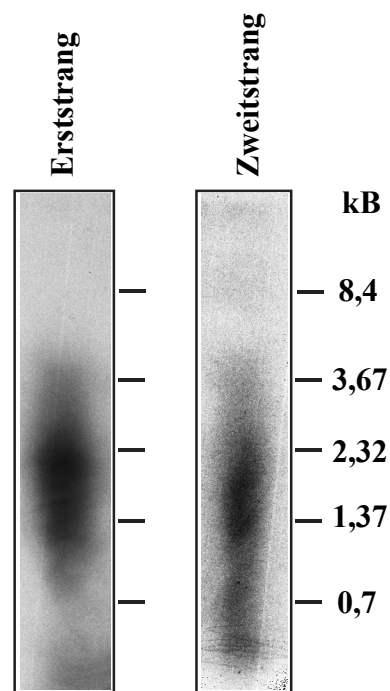


Abb. 13: Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese von Aliquots aus der Erst- und Zweitstrangsynthese

Erst- und Zweitstrangsynthese der cDNS wurden zur Kontrolle radioaktiv durchgeführt. Aliquots beider Reaktionen wurden auf einem alkalischen Agarosegel (1 %) aufgetrennt und durch Autoradiographie eines Röntgenfilms analysiert.

Nachdem Adaptoren an die Enden der cDNS ligiert worden waren, folgte zunächst die Größenfraktionierung der Fragmente durch eine Gelfiltration. Dazu wurde die cDNS auf eine Säule aus Sepharose CL-2B geladen und in 12 Fraktionen eluiert. Aliquots der Fraktionen 3 bis 12 wurden auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel (s. 2.2.6.3) analysiert. Das Autoradiogramm des Gels zeigte

(Abb. 14), daß erst ab Fraktion 4 cDNS eluiert wurde. Hochmolekulare Fragmente von bis zu 5 kB fanden sich dabei vornehmlich in den Fraktionen 4 bis 6, während mittlere und kleine Fragmente in den Fraktionen 7 und 8 eluiert wurden. Alle nachfolgenden Fraktionen enthielten nur noch sehr wenig, bzw. gar keine cDNS.

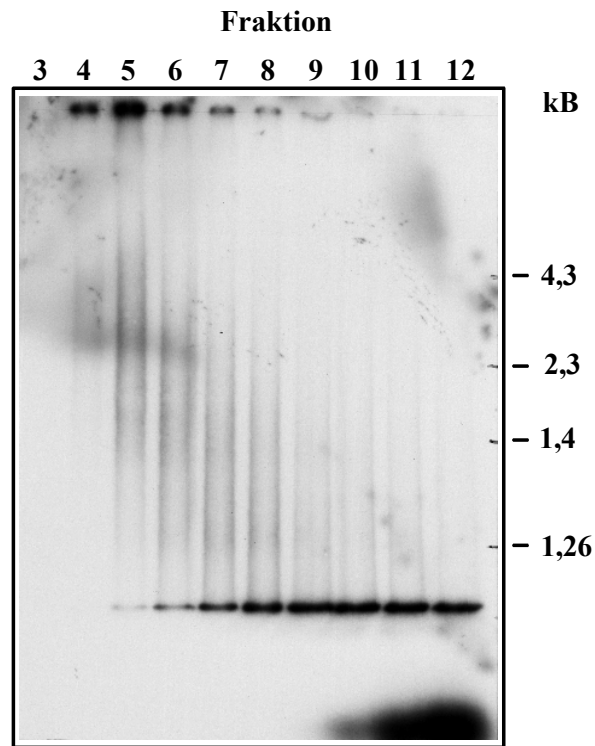


Abb. 14: Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese von Aliquots aus der cDNS-Größenfraktionierung

Nach der Zweitstrangsynthese erfolgte eine Größenfraktionierung der cDNS über eine Sepharose CL-2B Säule. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde auf einem Polyacrylamidgel (5 %) elektrophoretisch aufgetrennt (112V, 2 ½ h) und durch Autoradiographie eines Röntgenfilms analysiert.

3.2.2 Verpackung und Amplifikation der cDNS-Bank

Um möglichst die gesamte mRNS-Population vertreten zu haben, wurden zwei Ligationen und Verpackungen vorgenommen: für Bank „A“ (= große Fragmente) wurden Aliquots aus den Fraktionen 4 und 5, für Bank „B“ (= mittlere Fragmente) wurden Aliquots der Fraktionen 6 und 7 vereinigt und in den Uni-Zap™ XR Vektor ligiert. Nach der Ligation in den Vektor wurde die DNS mithilfe des

„Gigapack® III Gold Cloning Kit“ in Lambda-Phagenhüllen verpackt. Vor der weiteren Amplifikation wurden Phagentiter und die Rekombinationsrate (s. 2.2.10.2) bestimmt (Tab. 2.) Der Phagentiter ergab sich aus der Anzahl der „plaque forming units“ (pfu) aus einer 500 µl Verpackungsreaktion. Die Rekombinationsrate wurde durch eine blau/weiß-Selektion bestimmt (s. 2.2.5.11).

Tab. 2: Phagentiter und Rekombinationsrate der cDNS-Bank

cDNS-Bank	Phagentiter	Rekombinationsrate
A	~950.000 pfu	238:1
B	~660.000 pfu	325:1

Für Bank „A“ ergab eine Verrechnung von Phagentiter und Rekombinationsrate eine Ausbeute von ~945.000 pfu rekombinanter Phagen, womit sichergestellt war, daß auch Kopien schwach exprimierter mRNS-Moleküle in der cDNS-Bank vertreten waren (s. Stratagene - „instruction manual“). Bei Bank „B“ war die Ausbeute mit ~658.000 pfu rekombinanter Phagen dagegen etwas zu niedrig, um von einer repräsentativen cDNS-Bank auszugehen.

Um eine stabile cDNS-Banken mit einem hohen Phagentiter zu erhalten, wurden beide Banken je einmal amplifiziert (s. 2.2.10.1).

3.2.3 Qualität der cDNS-Bank

Eine qualitativ hochwertige cDNS-Bank zeichnet sich dadurch aus, daß sie eine möglichst große Anzahl an Vollängenklonen enthält. Um die durchschnittliche Länge der klonierten Fragmente in der cDNS-Bank „A“ (= große Fragmente) abschätzen zu können, wurde eine *in vivo*-Exzision durchgeführt (s. 2.2.10.3). Die aus dem Phagemid exzisierten Plasmide wurden mit *EcoR*I verdaut und auf einem Agarosegel analysiert. Die geschnittenen Plasmide zeigten Größen zwischen 3,5 kB (Nr.7) und 5,7 kB (Nr.9) (Abb. 15), abzüglich der 2,96 kB des Vektors (pBluescript) ergaben sich somit für die inserierten cDNS-Fragmente

Größen zwischen 0,5 und 2,7 kB. Es konnte also davon ausgegangen werden, daß die cDNS Bank eine große Anzahl an Vollängenklonen enthielt.

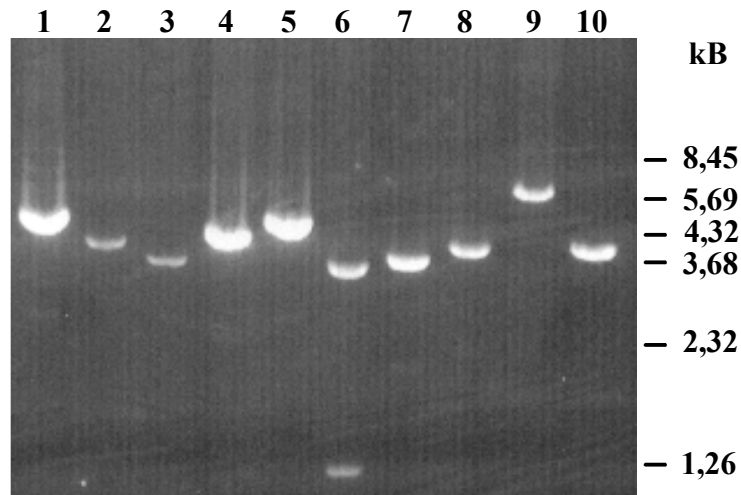


Abb. 15: Restriktionsanalyse von zehn *in vivo*-exziierten Plasmiden

Ausgehend von der amplifizierten cDNS-Bank, erfolgte eine *in vivo*-Exzision. Von zehn exziierten Plasmiden wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt und anschließend mit *Eco*R1 verdaut. Die geschnittenen Plasmide wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert (120 V, 3 h).

Die cDNS-Bank „A“ zeichnete sich also durch einen hohen Phagentiter und inserierten cDNS-Fragmenten bis mindestens 2,7 kB Länge aus; somit war sichergestellt, daß sie eine repräsentative Kopie der Poly(A)⁺RNS-Population aus *C. reinhardtii* zum Zeitpunkt LD 10 darstellte.

3.3 Sichtung der cDNS-Bank

Ziel war es in *C. reinhardtii* Gene zu detektieren, deren mRNS im 3'-UTR das Bindemotiv für CHLAMY 1 tragen. Die Charakterisierung des Bindemotivs durch gezielte *in vitro*-Mutagenesen hatte gezeigt, daß sieben „U(U)G“-Elemente für eine hohe Bindeaktivität von CHLAMY 1 nötig sind. Das Sichten der cDNS-Bank sollte deshalb mit einer Sonde durchgeführt werden, die gegen 7 „U(U)G“-Wiederholungen gerichtet ist.

3.3.1 Sichtung der cDNS-Bank durch Plaque-Hybridisierung

In der primären Sichtung (s. 2.2.10.2) wurden 402.000 pfu aus Bank „A“ und 162.000 pfu aus Bank „B“ mit *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ ausplattiert und auf Nylonmembranen übertragen. Als Sonde für die nachfolgende Hybridisierung (s. 2.2.7.8) wurde ein degeneriertes 17-mer (OMM40) ausgewählt, das komplementär zu der „U(U)G“-Wiederholung des *lbp* 3'-UTR war. Zusätzlich trug es am 3'- und am 5'-Ende als Variablen eine der vier Basen A,C,G oder T, um so die Hybridisierungstemperatur des Hybrids zu erhöhen und damit stringendere Bedingungen bei der Hybridisierung zu ermöglichen. Die Hybridisierung wurde nach Sambrook *et al.* (1989) (siehe auch 2.2.7.8) bei 37°C durchgeführt.

Durch eine ³²P-Markierung des 5'-Endes (s. 2.2.7.6) der Oligonukleotid-Sonde konnte eine Hybridisierung im Autoradiogramm detektiert werden. Die primäre Sichtung von Bank „A“ ergab elf Plaques, die ein Hybridisierungssignal zeigten, die Sichtung von Bank „B“ ergab drei positive Plaques. Beim Vereinzeln der Klone in der sekundären Sichtung ließ sich nur bei jeweils einem Klon aus Bank „A“ und Bank „B“ das Hybridisierungssignal reproduzieren. In der tertiären Sichtung zeigte letztlich nur noch der Klon aus Bank „A“ ein positives Signal. Nach einer *in vivo*-Exzision (s. 2.2.10.3) und Plasmidisolierung (s. 2.2.5.2) wurde das inserierte cDNS-Fragment sequenziert. Ein Abgleich der Sequenz mit „GenBank“ (NCBI) zeigte, daß es sich um die mRNA für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAP-DH) aus *C. reinhardtii* (Acc.Nr.: L27668) handelte. Eine Analyse der Sequenz ergab jedoch, daß die mRNA der GAP-DH kein Motiv mit 7 „U(U)G“-Wiederholungen enthielt. Die größte Homologie wurde zu einer Sequenz im kodierenden Bereich der mRNA gefunden (Abb. 16).

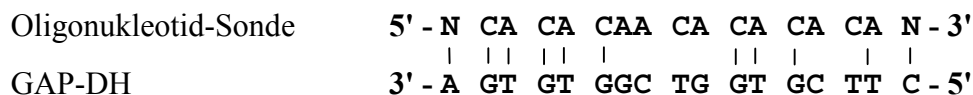


Abb. 16: Hybridisierung zwischen Oligonukleotid-Sonde und cDNS der GAP-DH

Hybridisierung zwischen dem 17-mer OMM40 und einer Sequenz ab Position 1190 im Gen der GAP-DH bei einer Homologie von 65 %.

Diese Sequenz hatte nur zwei „TG“-Elemente in Folge, durch weitere homologe Basen in der Umgebung war aber offenbar trotzdem eine Hybridisierung der Sonde möglich.

Das Ergebnis der Plaque-Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde verdeutlichte die Schwierigkeit, die nötige Spezifität mit einer so kurzen Sonde zu erreichen. Darüber hinaus war die Hybridisierung nicht auf „U(U)G“-Wiederholungen im 3'-UTR begrenzt, sondern konnte über das gesamte cDNS-Molekül erfolgen. Um diese Probleme zu umgehen wurde parallel eine auf PCR basierende Methode entwickelt, die eine gezielte Amplifikation von 3'-UTRs, die die „U(U)G“-Wiederholung enthalten, ermöglichen sollte.

3.3.2 Sichtung der cDNS-Bank durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Sichtung der cDNS-Bank auf RNS-Transkripte, die die „U(U)G“-Wiederholung in ihrem 3'-UTR tragen, wurde eine PCR-Methode ausgearbeitet, die in zwei Schritten die Amplifikation der gesamten cDNS ermöglichen sollte (Abb. 17). Die erste PCR diente zur gezielten Amplifikation von 3'-UTRs, die die „U(U)G“-Wiederholung enthalten. Dazu wurde einerseits ein Sinn-Oligonukleotid gewählt, das komplementär zur „U(U)G“-Wiederholung ist ([TG]₇), und andererseits ein reverses Oligonukleotid, das mit dem Poly(A)-Schwanz hybridisiert [(T₁₁)NN]. Nach der Sequenzierung des amplifizierten Fragments konnte daraus ein internes, reverses Oligonukleotid hergeleitet werden. Dieses sollte dann zusammen mit dem T3-Oligonukleotid, das 5' im flankierenden Vektor hybridisierte, die Vervielfältigung der aufwärts gelegenen Bereiche der cDNS ermöglichen.

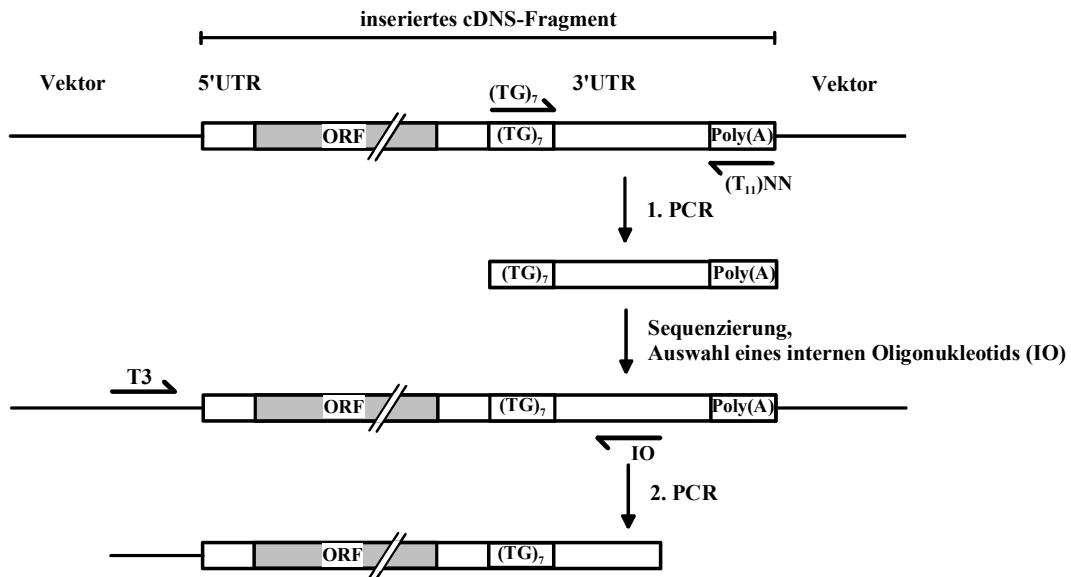


Abb. 17: Sichtung der cDNS-Bank mittels PCR auf RNS-Transkripte mit der „UG“-Wiederholung im 3'-UTR

Im ersten Schritt sollten mit einem Oligonukleotid gegen die „UG“-Wiederholung [(TG)₇] und einem Oligonukleotid gegen den Poly(A)-Schwanz [(T₁₁)NN] gezielt 3'-UTRs amplifiziert werden, die die „UG“-Wiederholung enthalten. Aus den Sequenzen der Amplifikate sollten dann interne Oligonukleotide (IO) abgeleitet werden, die zusammen mit dem T3-Oligonukleotid (T3) aus dem flankierenden Vektor die Amplifikation der 5'-gelegenen cDNS ermöglichen.

3.3.2.1 Amplifikation des 3'-UTRs

Die Amplifikation wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Liang & Pardee (1992) durchgeführt. Um die T₁₁-Oligonukleotide genau am Beginn des Poly(A)-Schwanzes zu verankern, enthielten sie am 3'-Ende zwei zusätzliche Basen. Ein Oligonukleotid wie 5'-T₁₁GT konnte sich so z. B. an eine mRNA anlagern, die die Basen „AC“ 5' von ihrem Poly(A)-Schwanz trägt. Schloß man ein „T“ als vorletzte Base aus, so ergeben sich 12 unterschiedliche Kombinationen für die letzten beiden 3'-Basen. Um die gesamte mRNA-Population zu sichten, mußte demnach das (TG)₇-Oligonukleotid (UG3) zusammen mit 12 verschiedenen T₁₁-Oligonukleotiden (UG4-UG15) getestet werden.

Da nur relativ kurze Fragmente (<500 Bp) zu erwarten waren, war es nötig das Standard PCR-Protokoll (s. 2.2.11) entsprechend anzupassen. Die Nukleotidkonzentration im Reaktionsansatz wurde auf 12,5 µM erniedrigt,

während die Oligonukleotid-Konzentration auf 2,5 μM erhöht wurde. Die Anlagerung der Oligonukleotide fand bei 37°C statt und mit einer Polymerisationszeit von nur 30 sec wurden 40 Amplifikationszyklen durchgeführt.

Um zunächst die Spezifität und Funktion der PCR-Reaktion zu testen, wurde eine Kontroll-PCR mit dem *lbp* 3'-UTR und einigen seiner mutierten Varianten als Matrizen durchgeführt (Abb. 18). Mit dem *lbp* 3'-UTR konnte, wie erwartet, ein 93 Bp-Fragment amplifiziert werden. Von den mutierten Derivaten mit nur sechs, fünf bzw. vier „T(T)G“-Elementen in Folge (pHW9-pHW11) konnte zwar auch noch eine Amplifikation erfolgen, jedoch mit deutlich abnehmender Signalstärke. Fehlten die zentralen fünf „T(T)G“ (pHW2) konnte kein Produkt mehr detektiert werden.

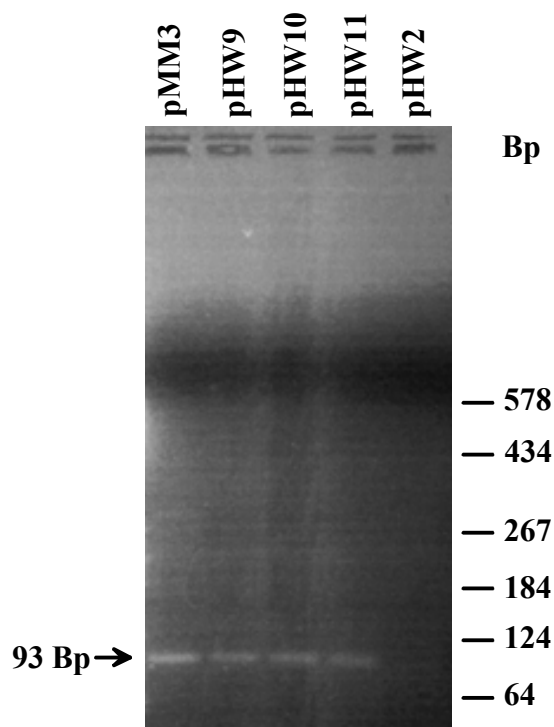


Abb. 18: Gelelektrophorese einer Kontroll-PCR zur Amplifikation von 3'-UTRs, die die „UG“-Wiederholung enthalten

Zur Überprüfung der PCR auf ihre Spezifität wurden der *lbp* 3'-UTR und seine mutagenisierten Varianten als Matrizen eingesetzt. Das Plasmid pMM3 enthält den *lbp* 3'-UTR und ergibt mit dem Oligonukleotid-Paar UG3/UG4 ein Amplifikat von 93 Bp. pHW9, pHW10 und pHW11, enthalten jeweils nur noch sechs, fünf bzw. vier „T(T)G“ in Folge. Bei pHW2 fehlen die zentralen fünf „T(T)G“-Elemente.

Die PCR-Bedingungen waren damit so gewählt, daß unter optimalen Bedingungen eine spezifische Amplifikation von 3'-UTRs mit vier und mehr „UG“-Elementen in Folge möglich war. Um sicherzustellen, daß auch von gering exprimierten mRNS eine effektive Amplifikation der 3'-UTRs mit „UG“-Repetition möglich war, wurde die Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotide zunächst nicht höher angesetzt.

Durch Proteolyse der Phagen aus cDNS-Bank „A“ (s. 2.2.10.4) konnte die cDNS freigesetzt werden, um anschließend als Matrize in die PCR eingesetzt zu werden. Pro Amplifikationsreaktion wurden 400 ng Matrizen-DNS zusammen mit Oligonukleotid UG3 und jeweils einem der 12 verankerten T₁₁-Oligonukleotide eingesetzt. Von den 12 durchgeführten Amplifikationen konnten mit den T₁₁-Oligonukleotiden, die die GA-, GT-, GG-, und CC-Verankerung hatten, reproduzierbare PCR-Produkte synthetisiert werden (Abb. 19).

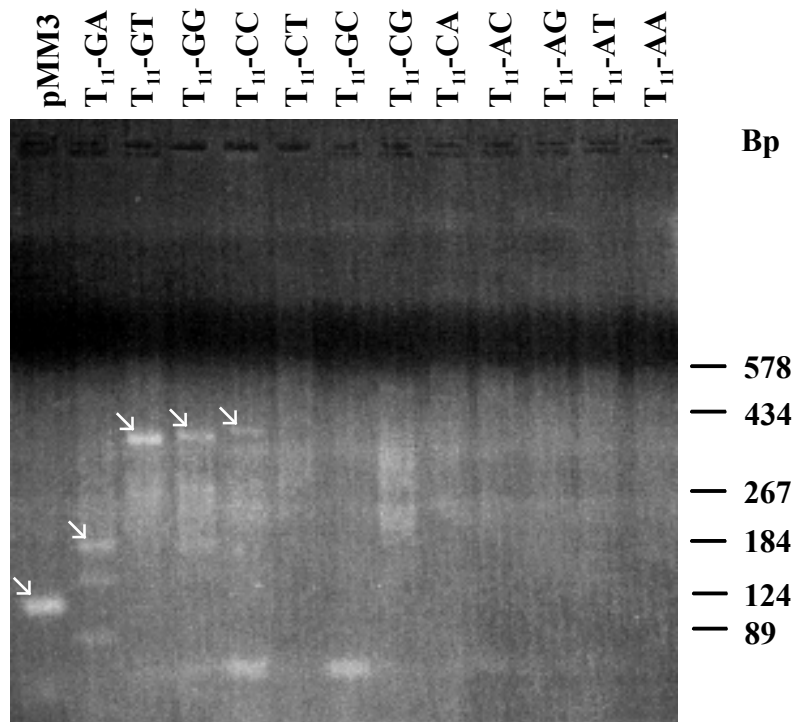


Abb. 19: Gelelektrophorese nach der Amplifikation von 3'-UTRs mit dem Oligonukleotid UG3 und dem (T₁₁)-Oligonukleotid mit seinen 12 unterschiedlichen Verankerungen

Die erste Spur zeigt das 93 Bp-Fragment (→ Pfeil) der Positiv-Kontrolle mit pMM3 als Matrize. In den nachfolgenden Spuren wurden PCR-Ansätze mit der *C. reinhardtii* cDNS-Bank als Matrize und dem Oligonukleotid-Paar UG3/ T₁₁-NN aufgetragen. Die (T₁₁)-Oligonukleotide mit GA-, GT-, GG- und -CC-Verankerung lieferten reproduzierbare Amplifikate definierter Größen (→ Pfeile).

Die vier amplifizierten Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (s. 2.2.12.4) und über glatte Enden (s. 2.2.12.2) in den mit *Sma*I geschnittenen pBluescript KS+ ligiert (s. 2.2.12.5). Nach Transformation der Plasmide in *E. coli* XL1-Blue (s. 2.2.5.9), konnten durch eine blau/weiß-Selektion (s. 2.2.5.11) Plasmide mit einem inserierten DNS-Fragment identifiziert und isoliert werden. Durch einen Restriktionsverdau mit *Pst*I/*Xba*I wurden die inserierten Fragmente wieder aus dem Vektor ausgeschnitten; dabei zeigte sich, daß mit der GA-, GT- und GG-Verankerung jeweils zwei unterschiedliche Fragmente von nahezu gleicher Größe amplifiziert worden waren (Abb. 20).

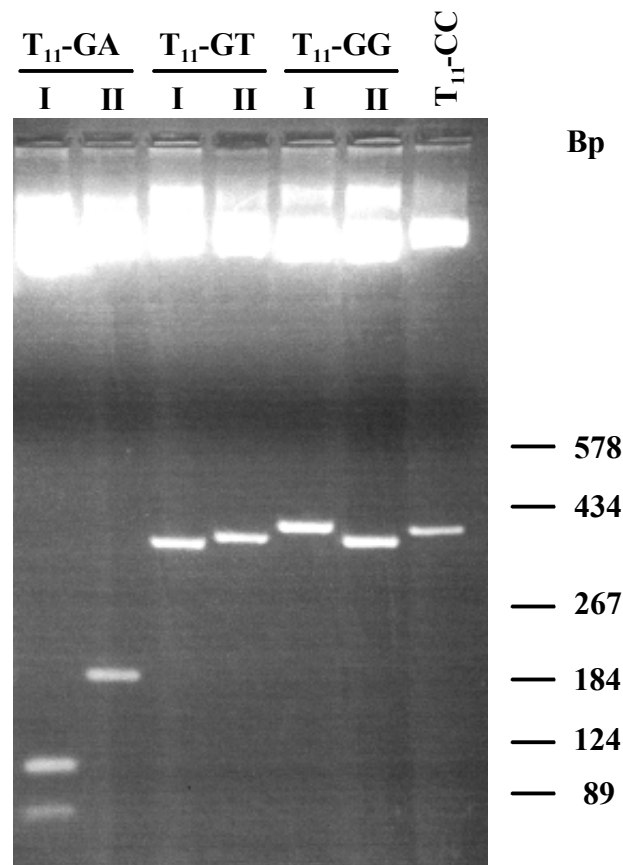


Abb. 20: Gelelektrophorese der klonierten PCR-Fragmente

Die PCR-Fragmente wurden über glatte Enden in den mit *Sma*I geschnittenen pBluescript KS+-Vektor ligiert (s. 2.2.12.5). Nach Exzision der Fragmente mit *Pst*I/*Xba*I zeigte sich, daß bei der PCR mit den Oligonukleotiden (T)₁₁-GA, (T)₁₁-GT und (T)₁₁-GG jeweils zwei unterschiedliche Fragmente (I und II), mit fast gleicher Größe, amplifiziert worden waren. Das exzisierte Amplifikat (T)₁₁-GA/II wurde darüber hinaus durch den Verdau in zwei Fragmente gespalten.

Somit waren sieben unterschiedliche Fragmente amplifiziert worden, die zur weiteren Analyse zunächst sequenziert wurden (s. 2.2.5.12). Die Sequenzen der Fragmente zeigten, daß die Produkte aus der PCR mit den GT-, GG- und CC-verankerten Oligonukleotiden die für *C. reinhardtii* typischen Polyadenylierungs-Signale „TGTGA“ bzw. „TGTA“ (Silflow *et al.*, 1985) in einem Abstand von 10 bis 13 Basen vor dem Poly(A)-Schwanz enthielten (Tab. 3). Die Lokalisation dieser Sequenzen im 3'-UTR der mRNA war somit sehr sicher. Ein Abgleich der Sequenzen mit „GenBank“ (NCBI) ergab darüber hinaus für das GG/I-Amplifikat eine 95 %ige Homologie zu einer Sequenz im 3'-Ende der Isocitrat-Lyase (ICL) aus *C. reinhardtii*. Da die ICL jedoch nur eine Repetition mit 3 „U(U)G“ in ihrem 3'-UTR trägt, und darüber hinaus keine 100 %ige Homologie vorlag, bestand die Möglichkeit, daß es sich um die mRNA einer Isoform der ICL handelte. Die Analyse der 5' gelegenen Genbereiche sollte weitere Erkenntnisse hierzu bringen. Ferner zeigte sich, daß eines der (T)₁₁-GG Amplifikate, bis auf eine deletierte Base und drei Basenaustausche (Tab. 3), identisch mit einem der (T)₁₁-GT Amplifikate war. Offenbar konnte bei einem der beiden T₁₁-Oligonukleotide eine fehlerhafte Anlagerung stattfinden, sodaß mit beiden das gleiche Amplikon vervielfältigt worden war. Die übrigen Amplifikate zeigten keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen. Abgesehen von den PCR-Produkten, die mit den „GA“-verankerten Oligonukleotiden entstanden, waren somit offenbar erfolgreich die 3'-Enden verschiedener mRNA aus *C. reinhardtii* vervielfältigt worden.

Tab. 3: Informationen aus den Sequenzen der amplifizierten PCR-Fragmente

Verankerung	Amplifiziertes Fragment	poly(A)-Signal	Homologie zu bekannten Genen	Internes Oligo
- GA	I 148 Bp	nein	nicht signifikant	OMM54
	II 164 Bp	nein	nicht signifikant	OMM53
- GT	I 345 Bp	ja	nicht signifikant	OMM52
	II 358 Bp	ja	nicht signifikant	OMM55
- GG	I 370 Bp	ja	ICL aus <i>C. reinhardtii</i>	OMM56
	II 357 Bp	ja	homolog zu -GT/II	-
- CC	376 Bp	ja	nicht signifikant	OMM57

3.3.2.2 Amplifikation der 5' der 3'-UTRs gelegenen Genbereiche

Aus den Sequenzen der amplifizierten 3'-UTRs wurden interne Oligonukleotide abgeleitet (OMM52-OMM57; Tab. 3). Diese konnten dann zusammen mit dem T3-Oligonukleotid in einer PCR zur Amplifikation der „upstream“ gelegenen Genbereiche eingesetzt werden. Da PCR-Produkte mit einer Länge bis zu mehreren Kilobasen erwartet werden konnten, wurde, abweichend vom Standardprotokoll (s. 2.2.11), mit einer auf 2,5 μ M erhöhten Oligonukleotid-Konzentration und einer auf 3 min verlängerten Polymerisationszeit; bei einer Zyklenzahl von 35, amplifiziert. Die Anlagerungstemperatur betrug 51°C und richtete sich somit nach dem T3-Oligonukleotid, das jeweils die geringste Schmelztemperatur hatte. Um die PCR-Produkte, die eine „T(T)G“-Wiederholung enthalten, direkt identifizieren zu können, wurden die Reaktionsansätze in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (HybondN) transferiert. Die Membran wurde dann in einer „Southern“-Hybridisierung mit einem 32 P-markierten Oligonukleotid gegen das „T(T)G“-Motiv (OMM40) hybridisiert (s. 2.2.7.8) (Abb. 21). Neben den PCR-Amplifikaten waren je 1 nmol der Plasmide pMM3, pHW10, pHW11 und pHW2 aufgetragen worden. Diese enthalten unterschiedlich lange „T(T)G“-Wiederholungen und dienten somit als Kontrolle für die Spezifität der Hybridisierungsreaktion. Wie das Autoradiogramm zeigt, waren die Hybridisierungsbedingungen so stringent gewählt (37°C), daß nur fünf oder mehr T(T)G in Folge (pHW10, pMM3) zu einer Hybridisierung der Sonde führten. Bei den PCR-Reaktionen zeigten sich deutliche Hybridisierungssignale mit Amplifikaten zwischen dem T3-Oligonukleotid und den Oligonukleotiden OMM54-OMM57. Die Banden mit dem jeweils stärksten Hybridisierungssignal wurden ausgewählt, um dann aus einem parallel angefertigten Gel mit den gleichen Proben ausgeschnitten zu werden. Nach Elution aus dem Gel (s. 2.2.12.4) wurden sie dann über glatte Enden in den mit *Sma*I geschnittenen pBluescript KS+-Vektor ligiert. Wie schon zuvor, wurden die Plasmide in *E. coli* XL1-Blue transformiert und über eine blau/weiß-Selektion charakterisiert. Aus den positiven Klonen wurde dann die Plasmid-DNS isoliert um vom T3- bzw. T7-Promotor aus das inserierte Fragment zu sequenzieren.

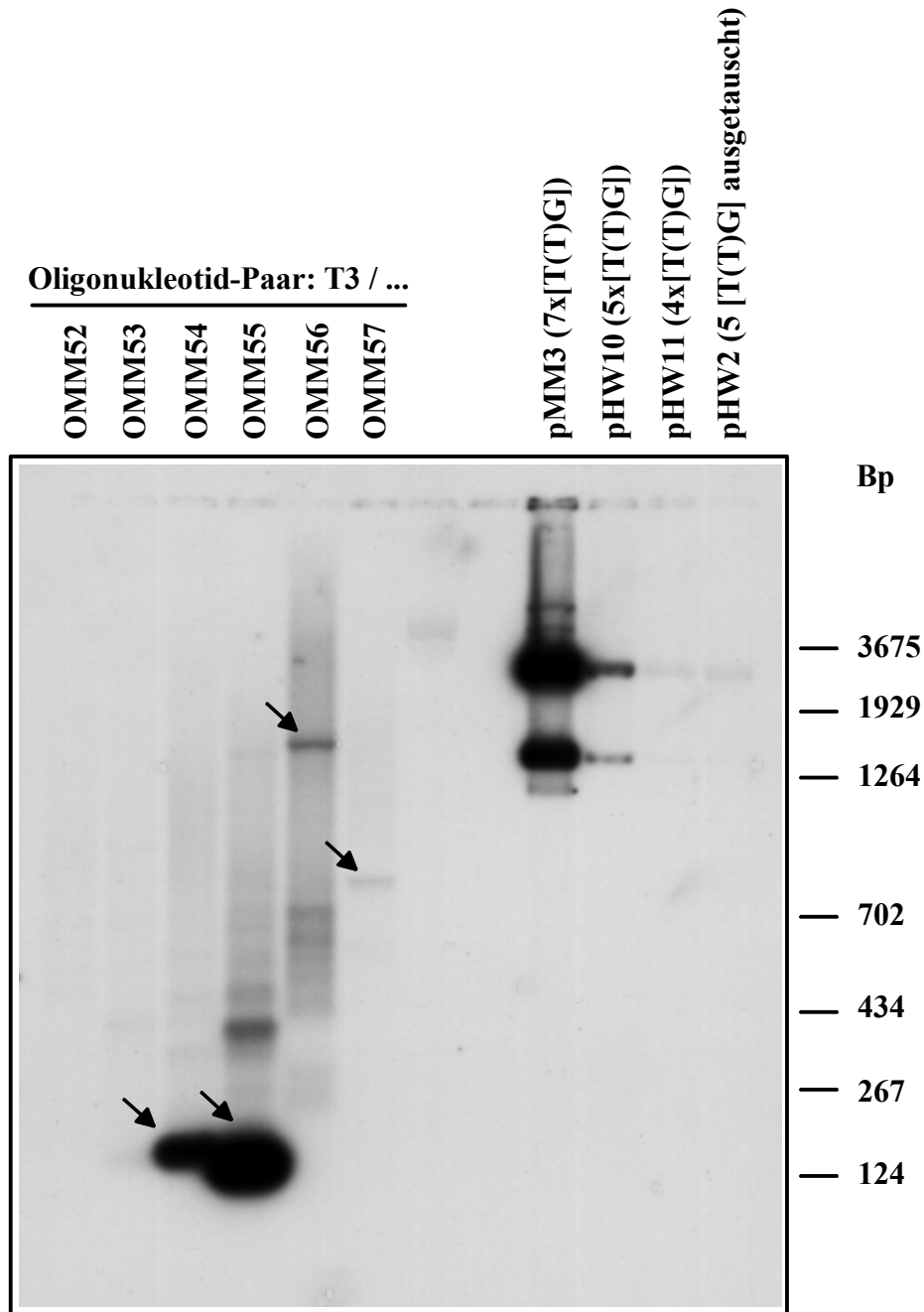


Abb. 21: Sichtung der Amplifikate durch „Southern“-Hybridisierung mit einem Oligonukleotid gegen die „T(T)G“-Wiederholung

Zur Amplifikation der „upstream“ liegenden Genbereiche wurden PCRs zwischen dem T3-Oligonukleotid und jeweils einem internen Oligonukleotid (OMM52 – OMM57) durchgeführt. Nach Elektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel wurde die DNS auf eine Nylonmembran (HybondN, Amersham) transferiert und mit einem Oligonukleotid gegen die „T(T)G“-Wiederholung (OMM40) hybridisiert. Zur Kontrolle auf spezifische Hybridisierung wurden zusätzlich gleiche Mengen (1 nmol) der Plasmide pMM3 (7x „T(T)G“), pHW10 (5x „T(T)G“), pHW11 (4x „T(T)G“) und pHW2 (die zentralen 5 „T(T)G“ fehlen) getestet. Die Pfeile markieren Bereiche im Gel, aus denen die DNS-Fragmente eluiert, kloniert und sequenziert wurden.

Das Amplifikat, das aus dem Oligonukleotid-Paar T3/ OMM54 hervorging, ließ sich auch nach mehrmaliger Wiederholung nicht sequenzieren (Tab. 4). Bei T3/ OMM55 war, wie die Analyse der Sequenz zeigte, einer der 3'-UTRs mit GT-Verankerung reamplifiziert worden; die Ursache hierfür lag offenbar in einer Kontamination der PCR durch das PCR-Produkt aus der vorangegangenen Amplifikation. Die Analyse des PCR-Produkts von T3/ OMM56 zeigte, daß es sich nicht um eine Isoform der ICL aus *C. reinhardtii* handelte, sondern um die bereits bekannte Form mit nur 3 „U(U)G“-Elementen im 3'-UTR. Mit T3/ OMM57 war ein Fragment amplifiziert worden, das keine signifikante Homologie zu bekannten Genen zeigte. Es enthielt ein offenes Leseraster (ORF) und ein Stop-Codon, jedoch fand sich im 3'-UTR ebenfalls nur ein Motiv mit drei „U(U)G“-Elementen.

Tab. 4: Charakteristika der Genbereiche, die sich „upstream“ der 3'-UTRs befinden

Amplifikat T3/...	Größe	Homologie	U(U)G- Repetition	ORF
OMM54	~200 Bp	nicht sequenzierbar	?	?
OMM55	162 Bp	Reamplifikat eines 3'-UTRs mit GT-Verankerung	?	?
OMM56	1293 Bp	98 % zu ICL	[U(U)G] ₃	ja
OMM57	832 Bp	nicht signifikant	[U(U)G] ₃	ja

Die Analyse der Daten zeigte, daß die Bedingungen in der ersten PCR nicht stringent genug gewählt worden waren, da auch 3'-UTRs mit nur 3 „U(U)G“-Elementen amplifiziert werden konnten.

Um die Amplifikation von 3'-UTRs mit „U(U)G“-Wiederholung unter stringenteren Bedingungen nochmals zu wiederholen, wurde eine spezielle Heißstart-Polymerase (AmpliTaQ Gold®, Perkin-Elmer, s. 2.2.11.3) eingesetzt. Da diese Polymerase erst durch eine Inkubation bei 95°C aktiviert wird, war eine Verlängerung von Oligonukleotiden, die beim Ansetzen der PCR-Reaktion unspezifisch an die cDNS hybridisierten, ausgeschlossen. Zusätzlich wurde zunächst die Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotide auf 42°C erhöht. Zur Amplifikation wurde sowohl die Heißstart-Technik, als auch die „Time Realase“-Technik (s. 2.2.11.3) getestet, jedoch ließ sich in keinem Fall mit einem der 12

Oligonukleotid-Paare eine Amplifikation erzielen. Auch eine Erniedrigung der Anlagerungstemperatur auf 37°C brachte keinen Erfolg.

3.3.2.3 Analyse der Sequenzdaten nach Aufnahme des *C. reinhardtii*-„EST Projekts“

Mit dem Beginn der Sequenzierung aller „ESTs“ („expressed sequence tags“) aus *C. reinhardtii* ab Januar 1999 bot sich ein erneuter Sequenzabgleich der amplifizierten 3'-UTRs (Tab. 3) mit „GenBank“ an, um so die zuvor unvollständig amplifizierten und sequenzierten mRNS-Fragmente auf das Vorhandensein einer „U(U)G“-Repetition hin untersuchen zu können. Das Ergebnis dieser Revision ist in (Tab. 5) zusammengefaßt. Außer bei einem der zwei Amplifikate, die mithilfe eines „GA“-verankerten Oligonukleotids generiert worden waren, konnte jedem der sequenzierten Fragmente ein Gen bzw. „EST“ aus *C. reinhardtii* zugeordnet werden (Stand: Juni 2002) (Tab. 5). Sequenzbereiche, die mit dem [T(T)G]₇-Oligonukleotid (UG3) übereinstimmen, sind grau unterlegt. Es zeigte sich, daß keiner der amplifizierten 3'-UTRs das perfekte Motiv mit sieben „U(U)G“-Elementen enthielt. In keinem Fall fanden sich mehr als vier „U(U)G“- in Folge. Da auch eine Sichtung aller bis dato sequenzierten Gene und „ESTs“ aus *C. reinhardtii* in Hinblick auf das [U(U)G]₇-Motiv negativ verlief, schien sich die Vermutung, daß das Bindemotiv in *C. reinhardtii* von dem in *G. polyedra* etwas abweicht, zu bestätigen.

Tab. 5: Vergleich des [T(T)G]₇-Oligonukleotids mit den [T(T)G]-Repetitionen der amplifizierten 3'-UTRs

Amplifikat	GenBank Acc.	Homologie zu T(T)G- Oligonukleotid	T(T)G in Folge	Gen
T(T)G-Oligonukleotid		TGTGTGTGTTGTGTG	7	<i>lbp</i>
(T) ₁₁ -GA II	AW721133	TacGTaTGTGTGTG	4	?
(T) ₁₁ -GT I	AV396210	TtgtTtTGTGTGTG	4	?
(T) ₁₁ -GT II	BE725690	aGTGTGTGTTtTGTG	3+2	?
(T) ₁₁ -GG I	U18765	cGgtgcaGTTGTGTG	3	<i>icl</i>
(T) ₁₁ -CC	BE352243	cGTcgtgGTTGTGTG	3	?

3.4 Sichtung von „GenBank“ beim NCBI

Die Sichtung der cDNS-Bank hatte gezeigt, daß es in *C. reinhardtii* eventuell kein Gen gab, dessen mRNS in ihrem 3'-UTR exakt das [U(U)G]₇-Motiv aus dem *lbp* 3'-UTR enthielt. Eine Suche in „GenBank“ mit dem [U(U)G]₇-Motiv führte ebenfalls zu keinem Ergebnis. Das Bindemotiv in *C. reinhardtii* variierte also vermutlich etwas von dem in *G. polyedra*. Erst die Suche mit einem einfachen (UG)₇-Motiv in „GenBank“ führte zur Identifikation von acht mRNS aus *C. reinhardtii*, die zwischen sieben und sechzehn „U(U)G“-Elemente in Folge im 3'-UTR trugen (Tab. 6). Einige zeigten in geringem Abstand zur „U(U)G“-Repetition noch zwischen einem und sieben flankierende „UG“-Elemente.

Tab. 6: *C. reinhardtii*-RNS-Transkripte mit einer „UG“-Repetition im 3'-UTR, die sich aus mindestens sieben „UG“-Elementen zusammensetzt

Gen	GenBank Acc.	„U(U)G“-Repetition mRNS-Sequenz 5' -----> 3'	UG- Elemente
<i>gs2</i>	AV395922	AGGGUGUGUGUGUGUGUGUCUGUCUA	7 + 1
<i>arg7</i>	AJ010110	CGGGUGUGUAUGUGUGUGUGUGUGCGUGUGUAAG	7 + 4
<i>rbcS1</i>	X04471	AGAGUGUGUGUGUGUGUGUUGUUGGUGUGUGGCUA	9 + 3
<i>nii1</i>	Y08937	UACGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUACG	9
<i>nrt2;3</i>	AJ223296	CGUUUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUAC	16
<i>lip-36G1</i>	U75345	CACGUGUGUGUGUGUGUGUGUAUGUUUGUGUGUGCGUGUGAGA	8 + 7
<i>yptC4</i>	U13167	GAGGUGUGUCUGUGUGUGUGUGUGAGUGCAUU	7 + 3
<i>lpcr-1</i>	U36752	CAGGUGUGUGUGUGUGUGCAGG	7

Diese mRNS lassen sich im wesentlichen zwei Gruppen zuordnen (Waltenberger *et al.*, 2001). Zum einen sind es mRNS, deren Produkte im Stickstoffwechsel involviert sind, und zum anderen mRNS, deren Produkte in Photosynthese und damit verknüpften Prozessen eine Rolle spielen. Zur ersten Gruppe zählt ein Nitrit/Nitrat-Transporter (NRT2;3, Gen: *nrt2;3*), der die Nitrit bzw. Nitrat-Aufnahme der Zelle kontrolliert (Quesada *et al.*, 1998a), die Nitritreduktase (NII1, Gen: *nii1*) (Quesada *et al.*, 1998b), die Nitrit zu Ammonium reduziert, die Glutamin-Synthetase 2 (GS2; Gen: *gs2*) (Chen and Silflow, 1996), die das Ammonium zu Glutamin umsetzt und die Argininosuccinat-Lyase (ASL, Gen:

arg7) (Auchincloss *et al.*, 1999), die die Spaltung von Argininosuccinat in Arginin und Fumarat katalysiert und damit das letzte Enzym im Biosyntheseweg zu Arginin darstellt.

Zu den in der Photosynthese involvierten Genprodukten, deren mRNS eine „UG“-Repetition enthält, zählt LIP36-G1 (Gen: *lip36-G1*), ein in der äußeren Chloroplastenmembran lokalisierter CO₂-Transporter (Chen *et al.*, 1997), die kleine Untereinheit der RUBISCO (Gen: *rbcS1*) (Goldschmidt-Clermont and Rahire, 1986), die mit den anderen Untereinheiten der RUBISCO die CO₂-Fixierung katalysiert und schließlich die lichtabhängige Form der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (L-POR, Gen: *lpcr-1*), die die Reduktion von Protochlorophyllid zu Chlorophyllid katalysiert (Li and Timko, 1996).

Einzig das Gen *yptC4* läßt sich keiner dieser beiden Gruppen zuordnen. Es kodiert für ein G-Protein, das vermutlich im Membranvesikel-Transport eine Rolle spielt (Dietmaier *et al.*, 1995).

Auffällig war weiterhin, daß die meisten der gefundenen mRNSs kernkodiert sind, im Cytoplasma translatiert werden und ihre Produkte schließlich in den Chloroplasten transportiert werden, wo sie dann aktiv sind.

Es stellte sich nun die Frage, ob CHLAMY 1 in der Lage war an die 3'-UTRs dieser mRNS zu binden und welche Rolle dabei die Länge der „UG“-Repetition spielte. Zu diesem Zweck sollten die acht 3'-UTRs zunächst kloniert werden. In „mobility shift“-Experimenten konnte dann die Affinität von CHLAMY 1 zu der jeweiligen „UG“-Repetition untersucht werden.

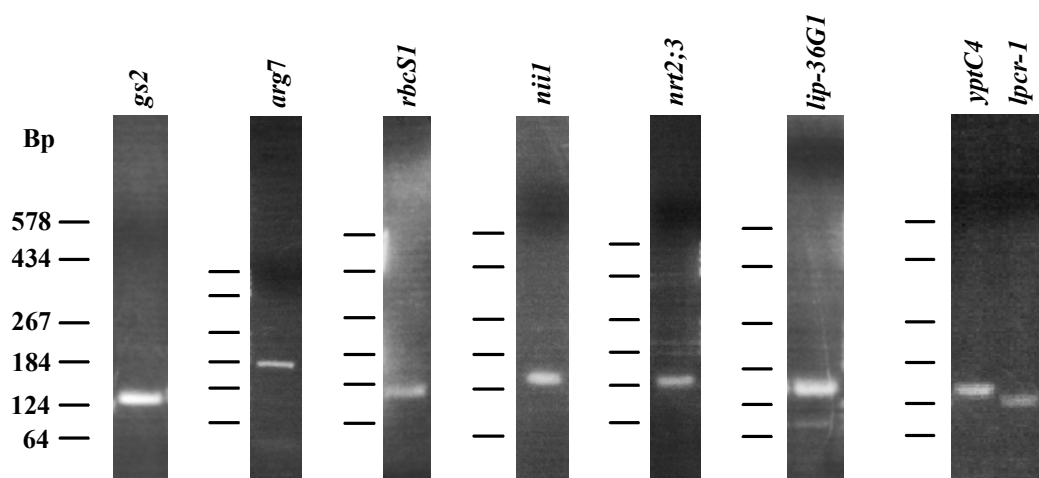
3.5 Klonierung der 3'-UTRs mit „UG“-Repetition

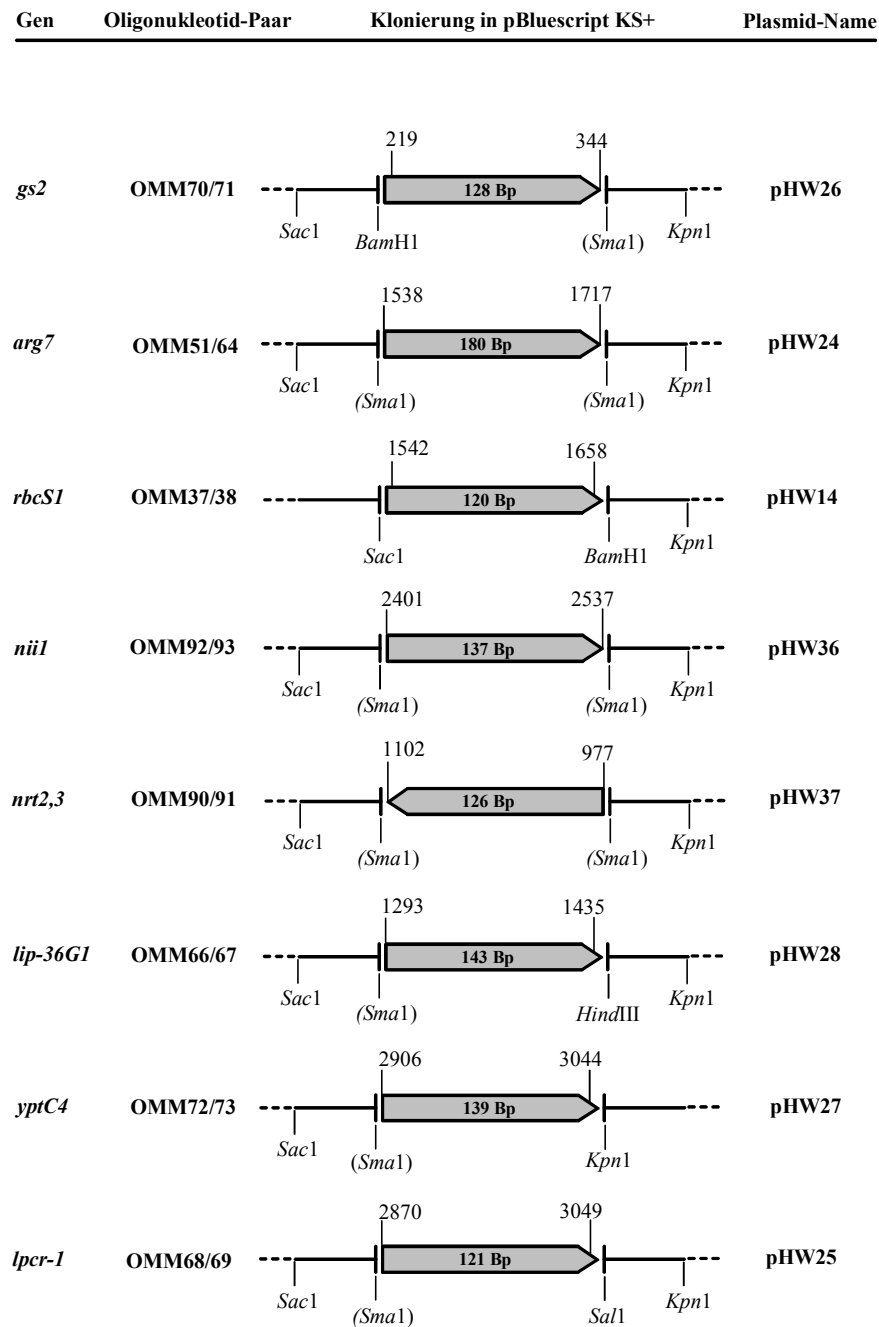
Die Amplifikation der 3'-UTRs erfolgte, sofern nicht anders angegeben, nach dem Standard PCR-Protokoll (s. 2.2.11). Bei der Vervielfältigung von *arg7*, *lip-36G1*, *lpcr-1*, *nii1* und *yptC4* mußte ein 7-deaza-dGTP Nukleotid-Mix (s. 2.2.11.2) eingesetzt werden, da diese *C. reinhardtii*-Gene aufgrund ihres hohen „GC“-Gehalts, starke Sekundärstrukturen ausbilden. Durch den Einsatz von 7-deaza-dGTP kann die Bildung dieser Sekundärstrukturen verhindert werden. Als Matrize diente entweder cDNS (*gs2*, *lip-36G1*, *lpcr-1*, und *yptC4*) oder genomische DNS

(*arg7*, *nrt2;3*). Die Amplifikation von *nii1* und *rbcS1* konnte über eine RT-PCR erzielt werden. Dazu wurden bei *nii1* 1 µg RNS/LD2 revers transkribiert (s. 2.2.11.6.1) und dann 2 µl der Reaktion in eine PCR mit dem 7-deaza-dGTP Nukleotid-Mix (s.o.) eingesetzt. Für die Amplifikation von *rbcS1* wurden 0,5 µg RNS/LD2 in einem Standardansatz des „Titan™ One Tube RT-PCR System“ (s. 2.2.11.6.2) verwendet.

Die Oligonukleotide wurden so gewählt, daß das „UG“-Motiv in der Mitte des klonierten Fragments zu liegen kam, lediglich bei *nrt2;3* war dies nicht möglich, da die Sequenz des terminalen Teils dieses 3'-UTRs nicht bekannt war. Die Größe der Fragmente sollte zwischen 100 und 200 Bp liegen. So konnte sichergestellt werden, daß die nachfolgend synthetisierten Transkripte lang genug waren, um ihre native Sekundärstruktur ausbilden zu können. Andererseits waren sie noch so kurz, daß im „mobility shift“-Experiment durch Protein retardierte RNS deutlich von freier RNS zu unterscheiden war. Soweit möglich wurden in die Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen integriert, sodaß eine gerichtete Klonierung in den Vektor pBluescript KS+ erfolgen konnte (Abb. 22 A und B). Dies sollte es ermöglichen, die Transkription der 3'-UTRs einheitlich am T7-Promotor der „multiple cloning site“ (MCS) des Vektors zu initiieren. Eine Ausnahme machte das *nrt2;3*-Amplifikat, das nur in umgekehrter Orientierung in den Vektor ligiert werden konnte und somit vom T3-Promotor aus transkribiert werden mußte.

A



B**Abb. 22: Amplifikation der 3'-Enden und Klonierung in pBluescript KS+**

(A) Elektrophorese der amplifizierten 3'-UTRs im Agarosegel (80V/ 2 h). Als Matrize für die PCR wurde entweder die cDNS-Bank (LD 10) (bei *gs2*, *lip-36G1*, *lpcr-1*, *yptC4*) verwendet, oder eine durch reverse Transkription synthetisierte cDNS (LD 2) (bei *rbcS1*, *nii1*). Bei *arg7* und *nrt2;3* ließ sich eine Amplifikation nur mit gDNS als Matrize erzielen. (B) Übersicht über die amplifizierten 3'-UTRs, ihre Klonierung in pBluescript KS+ und das daraus resultierende Plasmid. Das Klonierungsschema zeigt, über welche Restriktionsschnittstellen die Fragmente in den Vektor ligiert wurden; Schnittstellen in Klammern sind nicht mehr funktionell. Ferner ist angegeben, welcher Teil der jeweiligen cDNS (Gens) amplifiziert wurde und wie groß das ligierte Fragment war. Durch die Integration von Restriktionsschnittstellen in die Oligonukleotide (s. 2.1.9) verlängerten sich die Amplifikate zum Teil um wenige Basen.

Zur Klonierung wurden die spezifischen Amplifikate aus dem Gel eluiert (s. 2.2.12.4), sofern nötig mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut (s. 2.2.5.7.1) und anschließend über überstehende (*gs2*, *lip-36G1*, *lpcr-1*, *yptC4*, *rbcS1*) oder glatte Enden (*arg7*, *nii1*, *nrt2;3*) in pBluescript KS+ ligiert (s. 2.2.12.5). Um die Identität der klonierten Fragmente zu überprüfen, wurde in Kontrollverdaus jedes Plasmid einem, für das inserierte Fragment charakteristischen, Restriktionsverdau unterzogen. Aus Tab. 7 wird ersichtlich, durch welche spezifischen Restriktionsfragmente (fette Zahlen) das jeweilige Plasmid charakterisiert wird.

Wie die Restriktionsverdaus zeigen (Abb. 23), hatten alle acht Plasmide das erwartete Restriktionsmuster. Zusätzlich wurden die Plasmide pHW26 (*gs2*), pHW36 (*nii1*) und pHW37 (*nrt2;3*) auch noch durch eine Sequenzierung überprüft. Somit war sichergestellt, daß die richtigen Fragmente amplifiziert und kloniert worden waren.

Tab. 7: Restriktionsverdaus zur Charakterisierung der Plasmide

Plasmid	Restriktionsenzym	Restriktionsfragmente
pHW26	<i>Dde1</i>	1149 Bp, 823 Bp , 540 Bp, 409 Bp, 166 Bp
pHW24	<i>BstN1</i>	2219 Bp, 347 Bp , 288 Bp, 150 Bp , 121 Bp, 13 Bp
pHW14	<i>Dde1</i>	1001 Bp, 765 Bp , 540 Bp, 335 Bp, 240 Bp, 79 Bp
pHW36	<i>Bgl1/Nde1</i>	1581 Bp , 1266 Bp, 250 Bp
pHW37	<i>Dde1</i>	1130 Bp, 830 Bp , 540 Bp, 409 Bp, 166 Bp
pHW28	<i>PvuII</i>	2512 Bp, 398 Bp, 171 Bp
pHW27	<i>Bcl1</i>	3077 Bp
pHW25	<i>Sph1</i>	3047 Bp

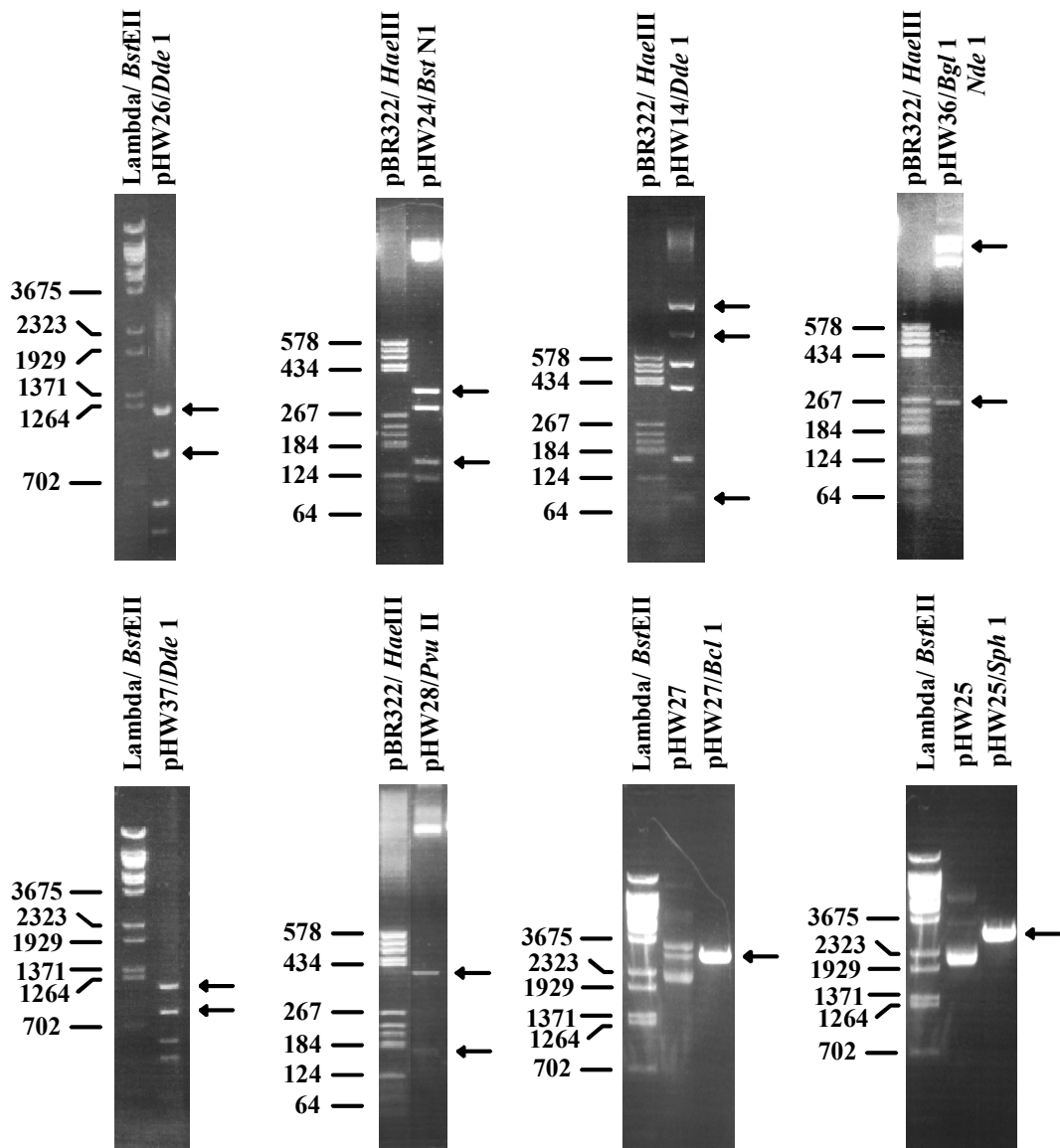


Abb. 23: Restriktionsanalyse der Plasmide

Die Plasmide wurden mit den in Tab. 7 aufgeführten Restriktionsenzymen verdaut und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (80 V, 2 h). Pfeile markieren Restriktionsfragmente, die durch einen Schnitt im inserierten Fragment entstehen.

3.6 Untersuchungen zur Bindung von CHLAMY 1 an die 3'-UTRs der acht mRNS

Es war gezeigt worden, daß es in *C. reinhardtii* drei Proteine gibt die an den *lbp* 3'-UTR binden und deren Bindeaktivitäten unter circadianer Kontrolle sind (Mittag, 1996). Als CHLAMY 1 wurde das Protein bezeichnet, das spezifisch an

die „U(U)G“-Repetition bindet und aufgrund seiner Eigenschaften als ein CCTR-Analoges betrachtet werden kann (Mittag, 1996).

Ob eine Bindung von CHLAMY 1 auch an die Transkripte der acht klonierten 3'-UTRs möglich war, sollten „mobility shift“-Experimente in Verbindung mit einer spezifischen Kompetition zeigen.

3.6.1 Untersuchung der Bindung im „mobility shift“-Experiment

Zur Synthese der ^{32}P -markierten Transkripte wurde eine *in vitro*-Transkription (s. 2.2.13.1.2) durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid durch einen Restriktionsschnitt am 3'-Ende des inserierten Fragments linearisiert (Tab. 8). Als Startpunkt für die Transkription diente der T3- bzw. T7-Promotor im Vektor, der Endpunkt war durch die Lage der Schnittstelle vorgegeben. Da Vektoranteile des pHW37-Transkripts (*nrt2;3*) komplementär zu dem nachfolgend eingesetzten Kompetitor-Transkript (*gs2*) waren, und so mit diesem hybridisieren konnten, wurde aus pHW37 durch einen *HindIII*/*PstI*-Verdau ein Teil der MCS deletiert, das resultierende Plasmid war pHW38.

Tab. 8: Linearisierung der Plasmide für die Transkription vom T3 bzw. T7 Promotor

Zur Synthese der Transkripte wurde jedes Plasmide mit einem spezifischen Restriktionsenzym linearisiert, das am 3'-Ende des inserierten Fragments schneidet. Die Transkription erfolgte dann vom T3 bzw. T7 Promotor aus.

3'-Ende von	Plasmid	Linearisierung mit	Transkription von
<i>lbp</i>	pMM3	<i>BglI</i>	T7
<i>lbp(UG)</i>	pMM14	<i>XbaI</i>	T7
<i>gs2</i>	pHW26	<i>EcoRI</i>	T7
<i>gs2_{mut}</i>	pAB1	<i>EcoRI</i>	T7
<i>arg7</i>	pHW24	<i>EcoRI</i>	T7
<i>rbcS1</i>	pHW14	<i>BamHI</i>	T7
<i>niil</i>	pHW36	<i>EcoRI</i>	T7
<i>nrt2;3</i>	pHW37/pHW38	<i>BamHI</i>	T3
<i>lip-36G1</i>	pHW28	<i>HindIII</i>	T7
<i>yptC4</i>	pHW27	<i>KpnI</i>	T7
<i>lpcr-1</i>	pHW25	<i>SalI</i>	T7

Die acht ^{32}P -markierten Transkripte wurden in einem „mobility shift“-Experiment (s. 2.2.13.1.4) mit einem *C. reinhardtii*-Rohextrakt (137c, LD12-13) getestet. Um zu untersuchen, ob die Interaktion eines Proteins auch spezifisch mit dem „UG“-Motiv des jeweiligen 3'-UTRs erfolgte, wurden zwei unmarkierte Transkripte als spezifische Kompetitoren eingesetzt. Das eine umfaßte den vollständigen *lbp* 3'-UTR (*lbp_{wt}* /pMM3, Abb. 3) und das andere einen *lbp* 3'-UTR, dem die Region mit der „UG“-Repetition fehlte (*lbp_(-UG)* /pMM14, Abb. 4). Wenn sich mit dem *lbp_{wt}*-Transkript die Bindung des Proteins kompetitieren ließ, nicht aber mit dem *lbp_(-UG)*-Transkript, so zeigte dies, daß das Protein spezifisch an das „UG“-Motiv band und mit großer Wahrscheinlichkeit CHLAMY 1 war.

Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente sind in Abb. 24 dargestellt. An das *lbp*-Transkript, das zum Vergleich herangezogen wurde, binden die drei Proteine CHLAMY 1, 2 und 3. Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, daß aber nur CHLAMY 1 an das „UG“-Motiv bindet (Mittag, 1996). Dieses Ergebnis wurde hier nochmal bestätigt durch den Einsatz des mutierten *lbp*-Transkripts (*lbp_{mut}* / pHW2), dem die zentralen fünf „UG“-Elemente fehlen. An dieses Transkript konnten nur noch CHLAMY 2 und 3 binden, nicht aber CHLAMY 1 (s. Abb. 24).

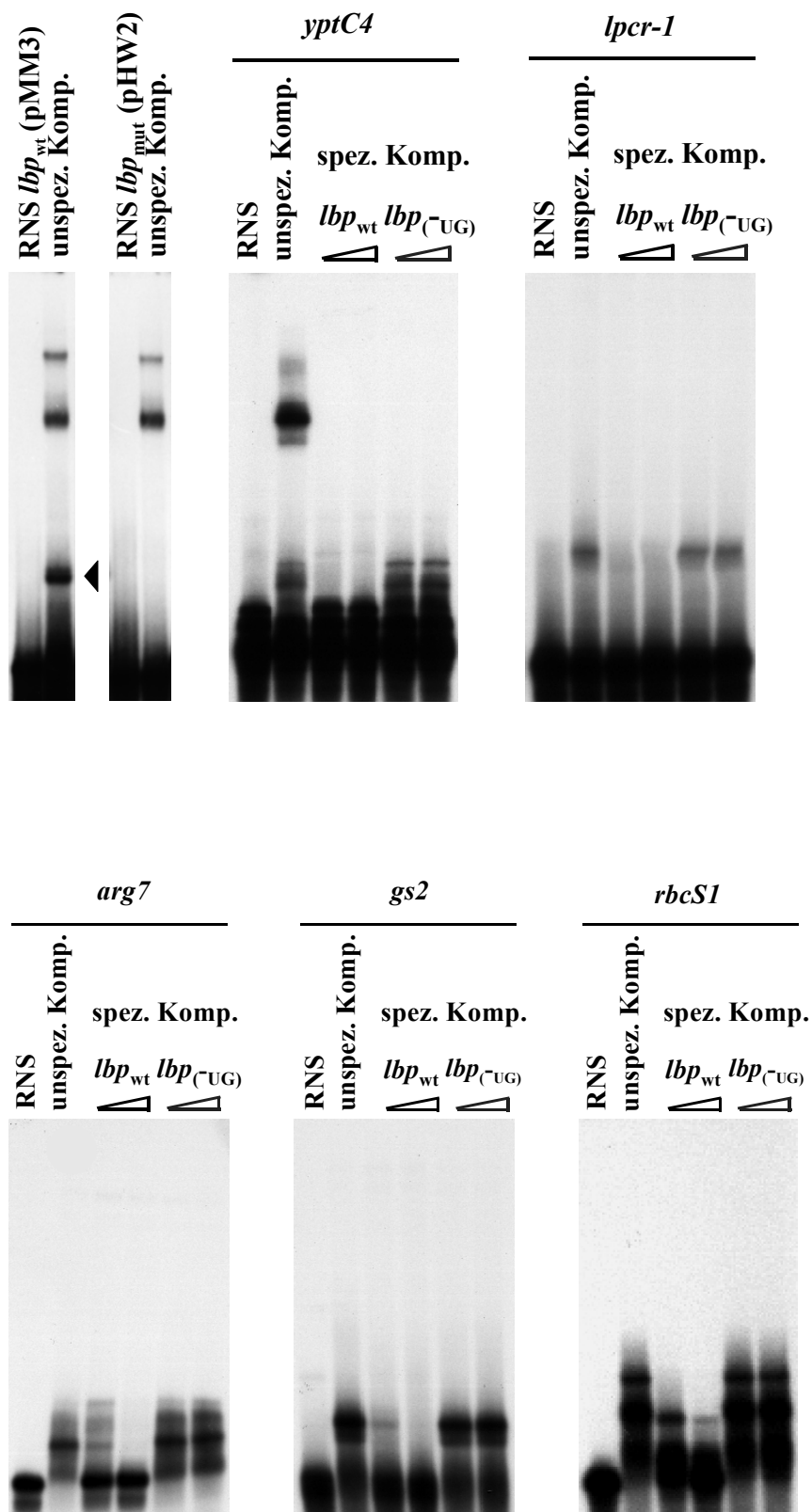


Abb. 24

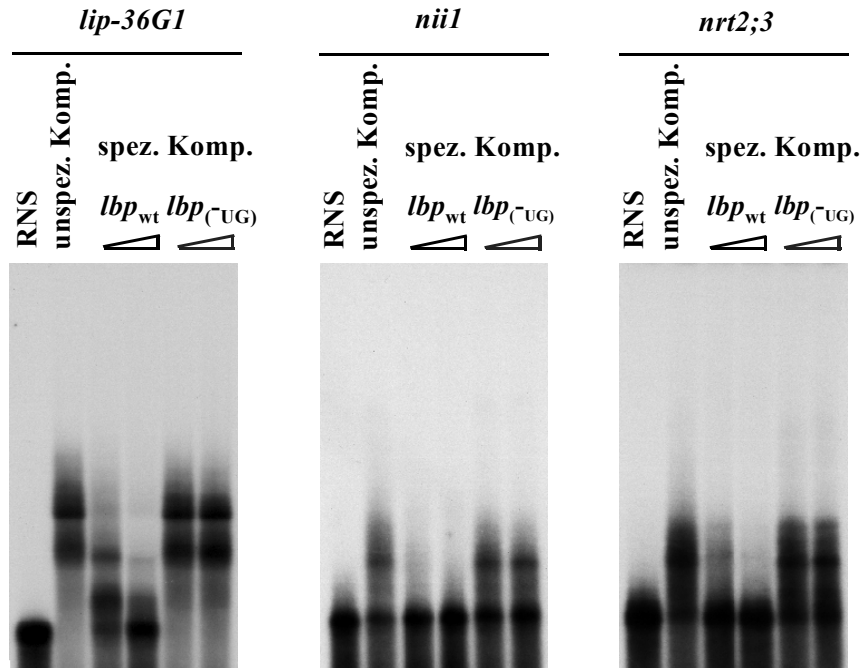


Abb. 24: Spezifische Konkurrenz der ^{32}P -markierten Transkripte mit dem *lbp_{wt}* bzw. *lbp_(-UG)*-Transkript

Autoradiogramme von „mobility shift“-Experimenten mit ^{32}P -markierten Transkripten der verschiedenen 3'-UTRs zusammen mit poly(G) als unspezifischer Kompetitor-RNS. Für die Anlagerungsreaktion wurden die Proben mit einem *C. reinhardtii*-Rohextrakt (LD12-13) inkubiert. Für die spezifische Konkurrenz wurden zunehmende Mengen unmarkierter RNS zugegeben. Als Kompetitor-RNS diente zum einen das *lbp_{wt}*-Transkript und zum anderen das *lbp_(-UG)*-Transkript, dem die gesamte „UG“-Repetition fehlt. Beide wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt. Eine Spur (RNS) zeigt jeweils die Mobilität des Transkripts allein. Die Position von CHLAMY 1 ist durch einen Pfeil markiert.

Von den acht untersuchten Transkripten aus *C. reinhardtii* wurde jedes durch ein Protein, mit einer ähnlichen elektrophoretischen Mobilität wie CHLAMY 1, gebunden; darüber hinaus tauchten in einigen Fällen noch weitere RNS/Proteinkomplexe auf. Die Konkurrenz mit zunehmenden Mengen der unmarkierten Transkripte zeigte, daß, mit Ausnahme von *yptC4*, alle RNS/Proteinkomplexe, mit dem *lbp_{wt}*- nicht aber mit äquimolaren Mengen des *lbp_(-UG)*-Transkripts kompetitiert werden konnten. Bei *yptC4* zeigte nur das Protein mit einer ähnlichen elektrophoretischen Mobilität wie CHLAMY 1 dieses Verhalten; die übrigen Proteine konnten mit beiden Transkripten kompetitiert werden, sie banden somit also „upstream“ oder „downstream“ des Bindemotivs für CHLAMY 1.

Die Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß CHLAMY 1, bzw. ein CHLAMY 1-ähnliches Protein, spezifisch mit der „UG“-Repetition eines jeden der untersuchten 3'-UTRs interagiert.

Bei *nrt2;3*, *rbcS1*, *arg7*, und *lip-36G1* waren mehrere RNS/Proteinkomplexe mit einer ähnlichen Mobilität wie CHLAMY 1 zu beobachten. Sie ließen sich, wie erwähnt, nicht mit dem *lbp*(_{UG})-Transkript kompetitieren. Hierfür gab es zwei mögliche Erklärungen: zum einen konnte es sich um Isoformen von CHLAMY 1 handeln, zum anderen war es denkbar, daß mehr als ein Molekül CHLAMY 1 an die „UG“-Repetition binden konnte. Diese Möglichkeit wurde dadurch bekräftigt, daß diese zusätzlichen RNS/Proteinkomplexe dann auftraten, wenn die „UG“-Repetition besonders lang war (*nrt2;3*, *rbcS1*) bzw. wenn die Zahl der flankierenden „UG“-Elemente sehr hoch war (*arg7*, *lip-36G1*).

3.6.2 Charakterisierung der RNS-Bindeproteine im „UV-crosslink“-Experiment

Um die, mit der „UG“-Repetition interagierenden, RNS-Bindeproteine noch näher zu charakterisieren, sollten durch „UV-crosslinking“-Experimente (s. 2.2.13.1.5) ihre molekularen Massen unter denaturierenden Bedingungen bestimmt werden.

In diesem Experiment wurden das Protein und die ³²P-markierte RNS an ihrer Bindestelle irreversibel miteinander verknüpft. Dies wurde erreicht, indem der RNS/Proteinkomplex einer starken UV-Strahlung ausgesetzt wurde, was zu einer kovalenten Bindung zwischen den Nukleotiden der RNS und bestimmten Aminosäuren des Proteins führte. Durch eine nachfolgende RNase-Behandlung wurde die RNS, bis auf den vom Protein geschützten Teil, verdaut. Wurde dieser Komplex über eine denaturierende SDS-PAGE (s. 2.2.6.9) aufgetrennt, ließ sich die molekulare Masse des Proteins, unter Berücksichtigung der gebundenen RNS, ermitteln. Um sicherzustellen, daß die nichtgebundene RNS völlig degradiert war, wurde parallel eine Negativkontrolle ohne UV-Behandlung durchgeführt.

An das als Positivkontrolle eingesetzte *lbp*_{wt}-Transkript band ein Protein von 43-45 kDa (Abb. 25), das eine Untereinheit von CHLAMY 1 darstellt (Schneid, 2002). Dieses war, ebenso wie im „mobility shift“-Experiment, mit dem mutierten

Transkript (*lbp_{mut}*) nicht detektierbar. Die „UV-crosslinking“-Experimente mit den acht Transkripten aus *C. reinhardtii* zeigten auch jeweils ein Protein mit exakt der gleichen Größe wie CHLAMY 1. Für *gs2* konnte durch die Negativkontrolle mit einem *gs2_{mut}*-Transkript (pAB1, Abb. 5) gezeigt werden, daß es CHLAMY 1 war, das spezifisch an die „UG“-Repetition band.

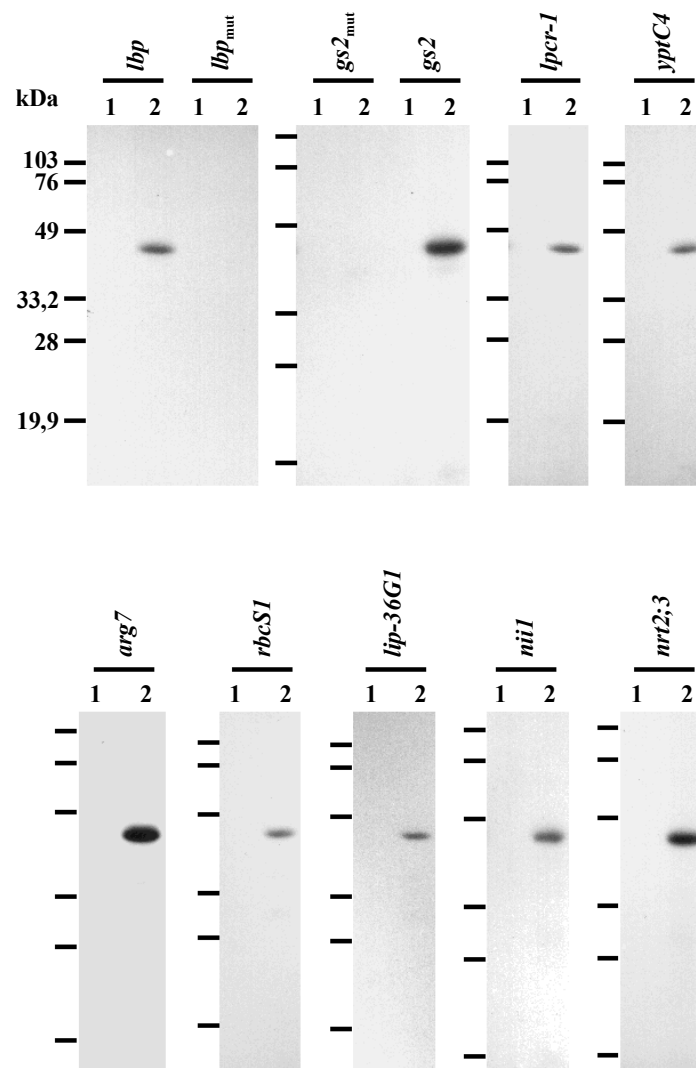


Abb. 25: Charakterisierung der RNS-Bindeproteine im „UV-crosslinking“-Experiment

Die Autoradiogramme zeigen „UV-crosslinking“-Experimente verschiedener ³²P-markierter Transkripte zusammen mit poly(G) als unspezifischem Kompetitor und einem *C. reinhardtii* Rohextrakt (LD12-13). Die RNS/Proteinkomplexe wurden, außer bei den Negativkontrollen (Spur 1), mit UV-Licht bestrahlt (Spur 2). Nach einer RNase-Behandlung wurden die Proben dann auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetrennt (150 V/3h). Als Kontrollen wurden in zwei Fällen (*lbp_{mut}*; *gs2_{mut}*) mutagenisierte Transkripte, an die CHLAMY 1 nicht binden kann, verwendet.

Diese Ergebnisse bestätigten, daß CHLAMY 1, das an die „UG“-Repetition im *lbp* 3'-UTR bindet, auch an die „UG“-Repetitionen der acht getesteten 3'-UTRs aus *C. reinhardtii* bindet. Da keine weiteren Bindeproteine im „UV-crosslink“-Experiment detektiert werden konnten, waren die zusätzlichen RNS/Proteinkomplexe, die bei Transkripten mit sehr langer „UG“-Repetition im „mobility shift“-Experiment zu beobachten waren, mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Bindung mehrerer CHLAMY 1-Moleküle an die „UG“-Repetition zurückzuführen. In diesem Zusammenhang ist jedoch anzumerken, daß einige Proteine, die an die „UG“-Repetition binden, erst nach einer Anreicherung im „UV-crosslink“-Experiment sichtbar werden (Schneid, 2002).

3.7 Die Bindeaktivität von CHLAMY 1 zu den verschiedenen 3'-UTRs variiert stark

Vorangegangene Untersuchungen mit CHLAMY 1 und dem CCTR aus *G. polyedra* hatten gezeigt, daß die Bindeaktivität zum *lbp*-Transkript eventuell von Sequenz und Sekundärstruktur der RNS abhängt (Mittag *et al.*, 1994; Mittag, 1996). Da sich die „UG“-Repetitionen der untersuchten 3'-UTRs aus *C. reinhardtii* in der Anzahl der „UG-Elemente“ doch erheblich unterscheiden, stellte sich die Frage, welchen Einfluß dies auf Bindeaktivität von CHLAMY 1 hatte. Konkurrenzexperimente mit zunehmender Menge unmarkierter Kompetitor-RNS (2x bis 700x) sollten darüber Aufschluß geben. Als Basis wurde das ³²P-markierte *gs2*-Transkript gewählt, da CHLAMY 1 eine hohe Affinität zu ihm zeigte. Bei der Bildung des Komplexes aus *gs2*-Transkript und CHLAMY 1 wurde mit unmarkierten Transkripten der zu untersuchenden 3'-UTRs kompetitiert (Abb. 26). Die Bindeaktivität des *gs2*-Transkripts allein wurde als 100 % definiert. Das molare Verhältnis, bei dem die Bindung von CHLAMY 1 durch Konkurrenz auf 50 % verringert wurde, diente als Maß für die Bindeaktivität des jeweiligen Kompetitors (Abb. 27).

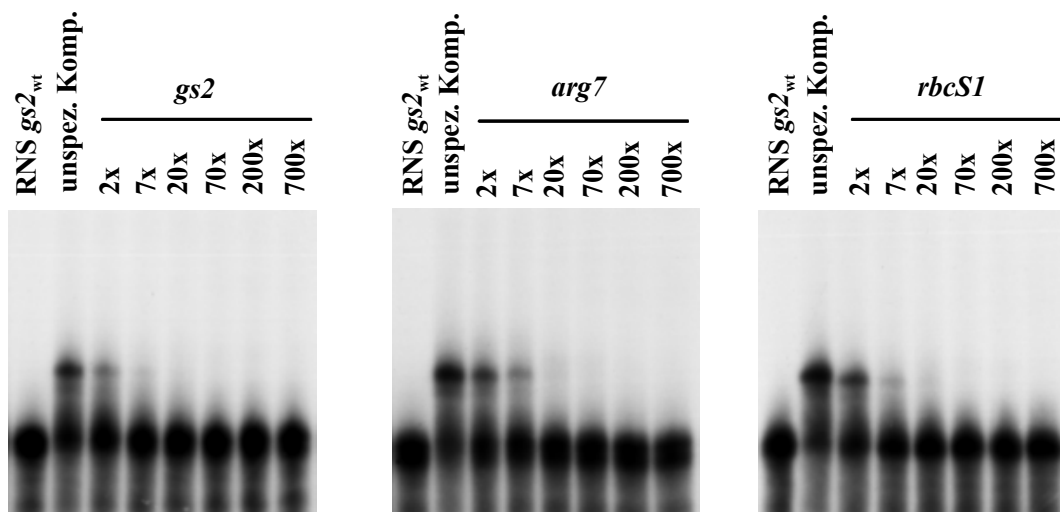


Abb. 26

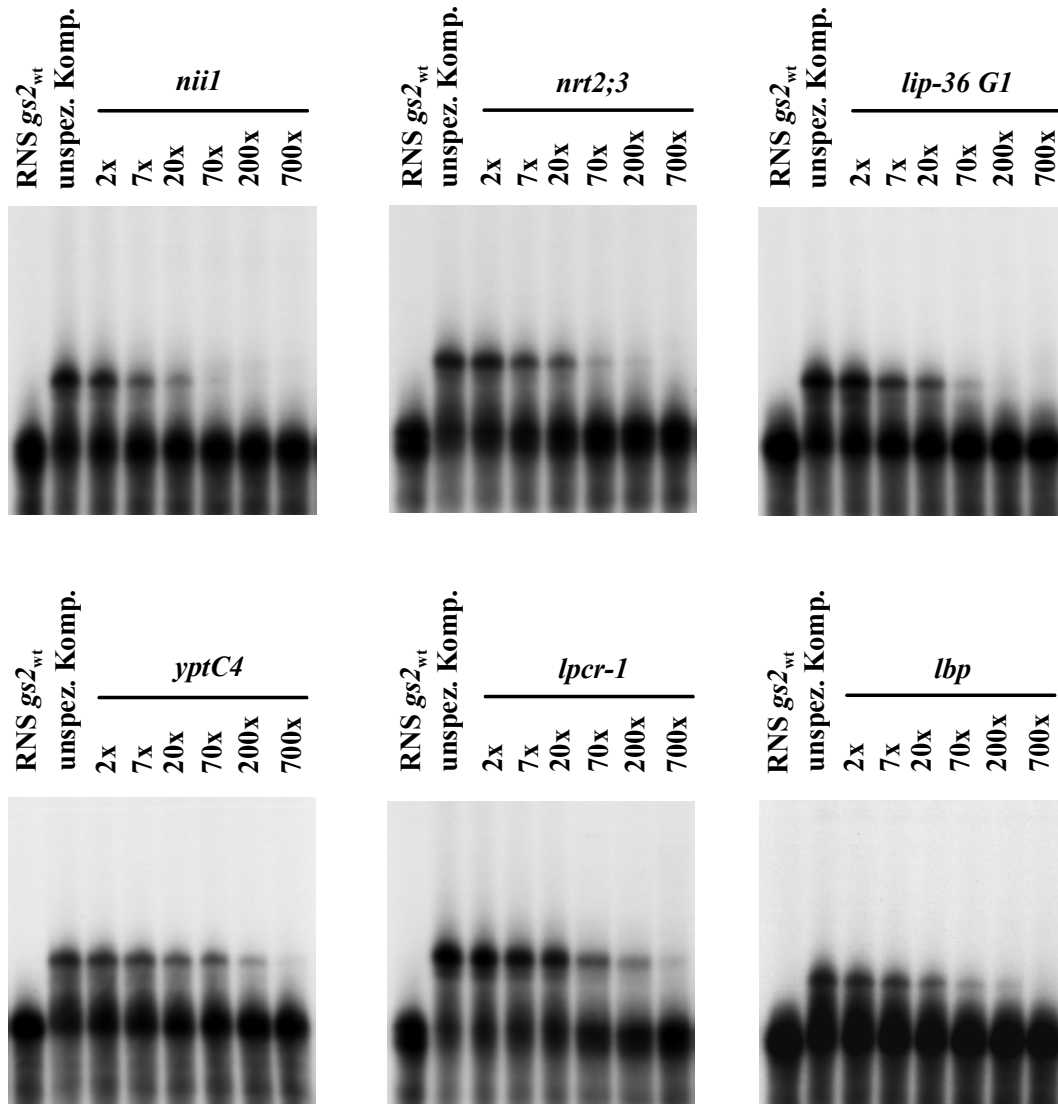


Abb. 26: Spezifische Competition des ^{32}P -markierten *gs2*-Transkripts mit verschiedenen unmarkierten Transkripten

Autoradiogramme von „mobility shift“-Experimenten mit ^{32}P -markiertem *gs2*-Transkript zusammen mit poly(G) als unspezifischer Kompetitor-RNS. Für die Anlagerungsreaktion wurden die Proben mit *C. reinhardtii* Rohextrakt (LD12-13) inkubiert. Neben der Kontrolle mit unspezifischem Kompetitor wurde der Anlagerungsreaktion unmarkierte Kompetitor-RNS im zweifachen bis siebenhundertfachen Überschuß zugegeben. Die jeweilige Kompetitor-RNS ist über den Spuren angezeigt. Die erste Spur (RNS *gs2*_{wt}) zeigt immer die Mobilität des ^{32}P -Transkripts allein. Gezeigt ist jeweils nur eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

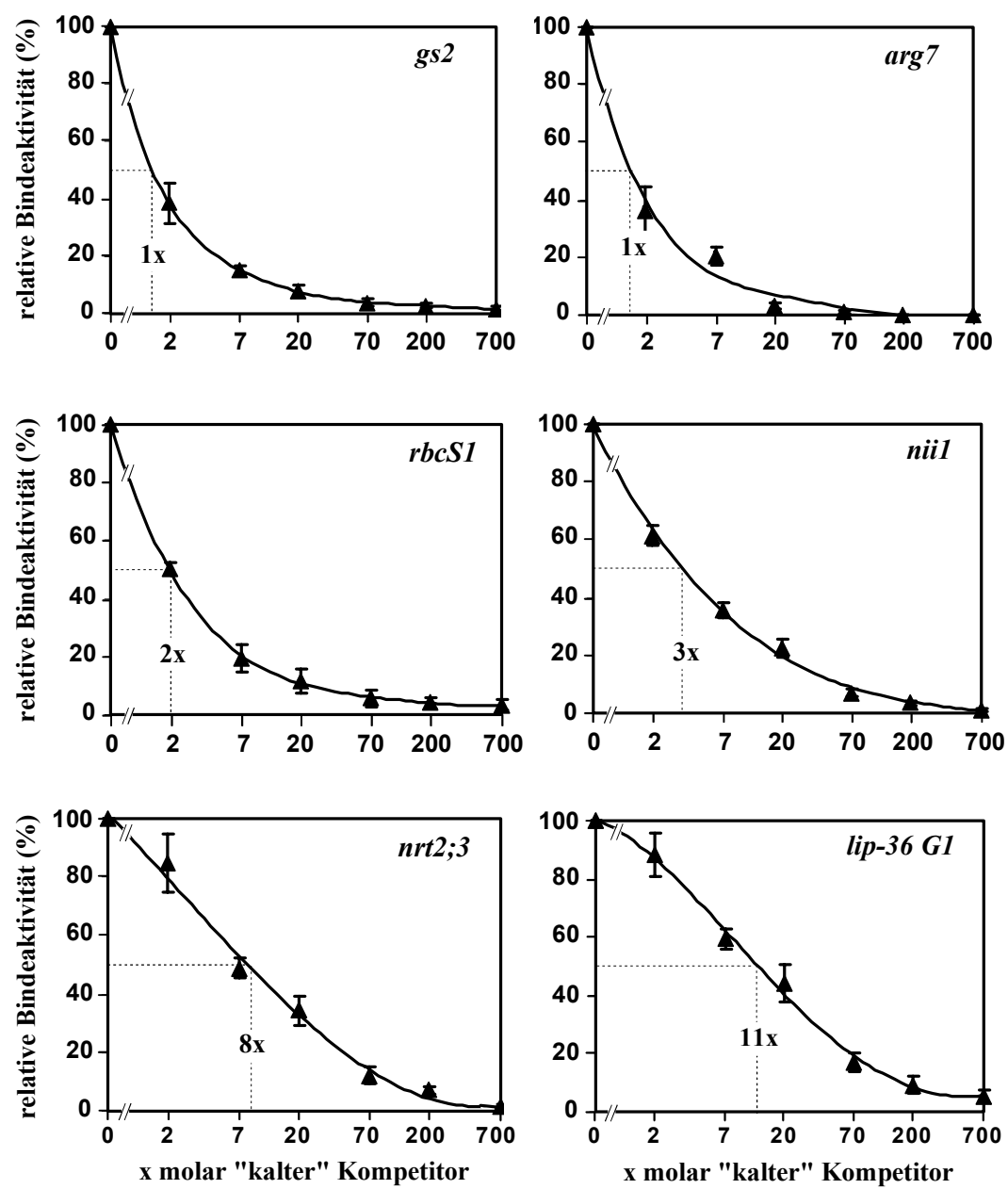


Abb. 27

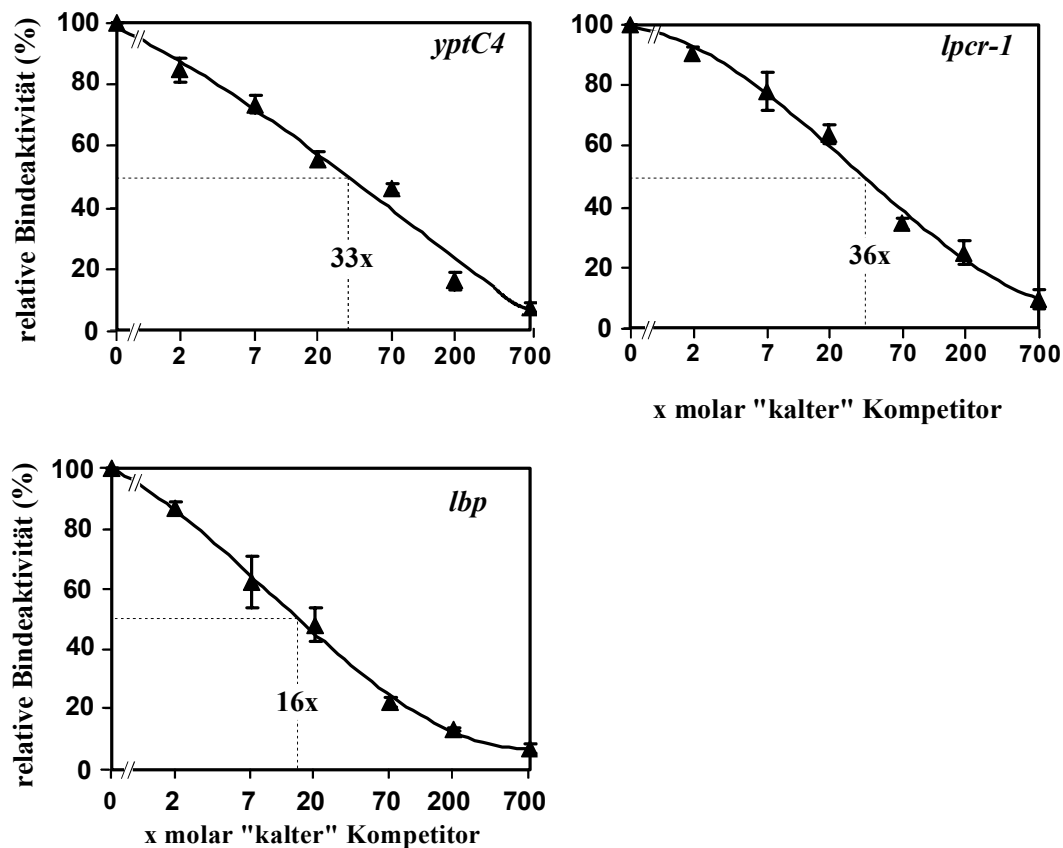


Abb. 27: Quantitative Auswertung der Konkurrenzexperimente

Jede Konkurrenzkurve zeigt den Mittelwert aus drei, voneinander unabhängigen, Experimenten. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Intensität der RNS/Proteinkomplexe wurde mithilfe eines Phosphoimagers und der TINA 2.09g-Software ermittelt. Das Signal bei Zugabe des unspezifischen Kompetitors wurde jeweils als 100 % relative Bindeaktivität definiert. Der molare Überschuss eines Transkripts für eine 50 %ige Konkurrenz wurde graphisch aus der Kurve ermittelt.

Die höchste Affinität zeigte CHLAMY 1 zu den *gs2*- und *arg7*-Transkripten, bei denen schon ein einfacher Überschuss zu einer auf 50 % reduzierten Signalstärke des RNS/Proteinkomplexes führte (Abb. 27); ihnen folgten *rbcS1*, *nii1* (2x bzw. 3x Überschuss) und dann *nrt2;3* und *lip-36G1* (8x bzw. 11x Überschuss). Die geringste Bindeaktivität zeigte CHLAMY 1 gegenüber *yptC4* und *lpcr-1* (33x bzw. 36x Überschuss). Beim *lbp* 3'-UTR aus *G. polyedra* führte erst ein 16facher Überschuss zu einer auf 50 % reduzierten Signalstärke, er gehörte somit eher zu den schwachen Kompetitoren.

Setzte man die Affinität von CHLAMY 1 zu den Transkripten in Bezug zur Länge ihrer „UG“-Repetition, so ließ sich kein direkter Zusammenhang erkennen (Tab.

9): *gs2*, einer der stärksten Kompetitoren, hat mit 7+1 „UG“-Elementen eine kürzere „UG“-Repetition als *yptC4* (7+3 „UG“-Elemente), der einer der schwächsten Kompetitoren ist. Ebenso zeigte CHLAMY 1 zu *nrt2;3* mit dem Maximum von 16 „UG“-Elementen nur eine mittlere Affinität. Es wurde somit deutlich, daß die Länge der „UG“-Repetition in Hinblick auf die Affinität von CHLAMY 1 nur eine untergeordnete Rolle spielt. Viel entscheidender für eine gute Bindung waren vermutlich andere Faktoren; hierzu könnten die flankierenden Bereiche und/oder die Sekundärstruktur der RNS zählen.

Tab. 9: Molare Verhältnisse unmarkierter Kompetitor-RNS, die zu einer auf 50 % reduzierten Bindung zum 32P-markierten *gs2*-Transkript führen, im Vergleich zur Anzahl der „U(U)G“-Elemente.

Transkript	Molarer Überschuß „kalter“ Kompetitor-RNS	U(U)G-Elemente
<i>gs2</i>	1	7 + 1 flankierend
<i>arg7</i>	1	7 + 4 flankierend
<i>rbcS1</i>	2	9 + 3 flankierend
<i>nii1</i>	3	9
<i>nrt2;3</i>	8	16
<i>lip-36G1</i>	11	8 + 7 flankierend
<i>lbp</i>	16	7
<i>yptC4</i>	33	7 + 3 flankierend
<i>lpcr-1</i>	36	7

3.8 Untersuchungen zur circadianen Regulation der Argininosuccinat-Lyase in *C. reinhardtii*

Nachdem eine spezifische Interaktion zwischen CHLAMY 1 und den 3'-UTRs der untersuchten mRNS gezeigt worden war, stellte sich die Frage, ob und inwieweit die Produkte dieser Gene einer Regulation durch die innere Uhr unterworfen sind. Um dies zu untersuchen boten sich vor allem Stoffwechselenzyme wie die Glutamin-Synthetase 2 (GS2), die Argininosuccinat-

Lyase (ASL), die Nitrit-Reduktase (NII1) und die Licht-abhängige Form der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (L-POR) an, denn eine circadiane Regulation sollte sich durch die Bestimmung der Enzymaktivität unter konstanten Bedingungen zeigen lassen. Es war zu erwarten, daß der Einfluß einer circadianen Regulation der Translation bei den mRNS mit einer hohen Affinität zu CHLAMY 1 besonders deutlich wurde. Aus diesem Grund schienen die Glutamin-Synthetase 2 (GS2) und die Argininosuccinat-Lyase (ASL) für nähere Untersuchungen besonders interessant.

In *C. reinhardtii* gibt es zwei Isoformen der Glutaminsynthetase, eine cytosolische (GS1) und eine im Chloroplasten lokalisierte (GS2) (Florencio & Vega, 1983), deren mRNS die „UG“-Repetition enthält. Proteinrohextrakte aus *C. reinhardtii* enthalten stets beide Formen, sodaß eine gezielte Untersuchung zur Regulation der GS2 erst nach einer Trennung der beiden Isoformen möglich ist. Dies konnte über eine schwache Anionenaustauscher-Säule erfolgen, jedoch war der Aufwand wegen der Vielzahl der zu untersuchenden Zeitpunkte sehr hoch und so wurden diese Experimente zunächst zurückgestellt.

Die Argininosuccinat-Lyase (ASL), die vermutlich im Cytosol lokalisiert ist (Auchincloss *et al.* 1999), katalysiert die Spaltung von Argininosuccinat in Arginin und Fumarat (Abb. 28) und stellt damit das letzte Enzym im Biosyntheseweg zu Arginin dar. Über Fumarat ist darüber hinaus eine enge Verknüpfung zum Zitronensäurezyklus gegeben. Die ASL stellt somit ein wichtiges Enzym im Primärstoffwechsel der Zelle dar.

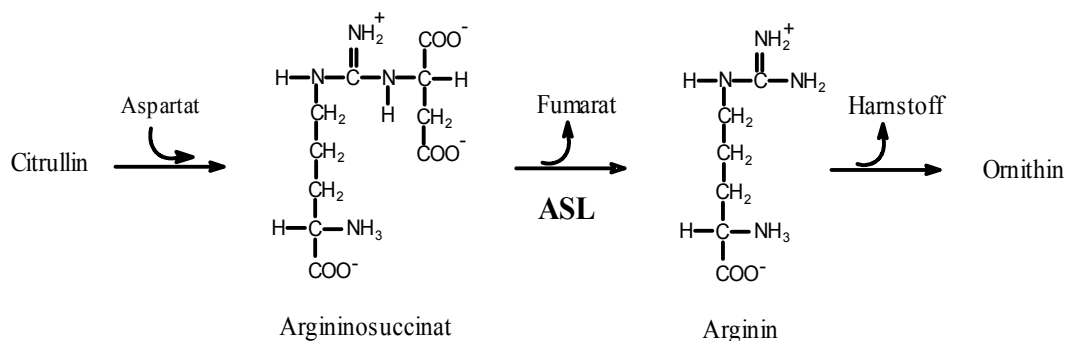


Abb. 28: Reaktion der Argininosuccinat-Lyase (ASL)

Die Argininosuccinat-Lyase katalysiert die Spaltung von Argininosuccinat in Arginin und Fumarat.

Nur ein Gen (*arg7*) kodiert für die ASL (Loppes & Matagne, 1972). Das Translationsprodukt ist ein ~50 kDa-Protein (Farrell & Overton, 1987) von dem sich vermutlich vier Einheiten zum aktiven Enzym mit einem Molekulargewicht (Mw) von 218 kDa (± 25 kDa) zusammenlagern. *Arg7* ist einer der wenigen *loci* in *C. reinhardtii*, für den auxotrophe Mutanten verfügbar sind. Da die Mutation durch Transformation mit dem *arg7*-Gen wieder komplementiert werden kann (Debuchy *et al.*, 1989), ist es möglich relevante Bereiche des Gens zu mutieren und so die Auswirkungen auf die Regulation von Transkription und Translation zu untersuchen.

Unterliegt die Aktivität der ASL der circadianen Kontrolle, so ist zu untersuchen, auf welcher(n) Ebene(n) die Regulation erfolgt. Neben Synthese und Abbau der mRNA können vor allem Translationsrate und Proteinstabilität von Bedeutung sein; auch posttranslationale Modifikationen sind zu berücksichtigen.

3.8.1 Circadiane Kontrolle der ASL Enzym-Aktivität

Um zu untersuchen, ob die Aktivität der ASL über einen Tag/Nachtzyklus variiert, wurden *C. reinhardtii*-Zellen (137c) in einem 12 h Licht/12 h Dunkelzyklus kultiviert und alle vier Stunden geerntet. Von jedem Zeitpunkt wurde ein Proteinrohextrakt angefertigt (s. 2.2.4.2) und mit Argininosuccinat als Substrat in einem ASL-Enzymtest (s. 2.2.16) getestet. Die Bestimmung des synthetisierten Arginins erfolgte durch die Sakaguchi-Reaktion (s. 2.2.16), kolorimetrisch bei 514 nm. Gemessen wurde gegen einen Reaktionsansatz ohne Substrat. Über eine Eichgerade, die mit Argininstandards erstellt worden war, konnte die jeweilige Enzymaktivität berechnet werden. Da *C. reinhardtii* Rohextrakte auch eine geringe Arginaseaktivität aufweisen, wurde parallel die Aktivität der Arginase über die Abnahme des endogenen Arginins bestimmt (s. 2.2.16). Diese Methode erlaubte jedoch nur sehr ungenaue Aussagen bezüglich der tatsächlichen Arginaseaktivität, da das endogene Arginin zeitlichen Schwankungen unterworfen ist (Daten nicht gezeigt). Ein Test zur direkten

Bestimmung der Arginase-Aktivität stand zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zur Verfügung.

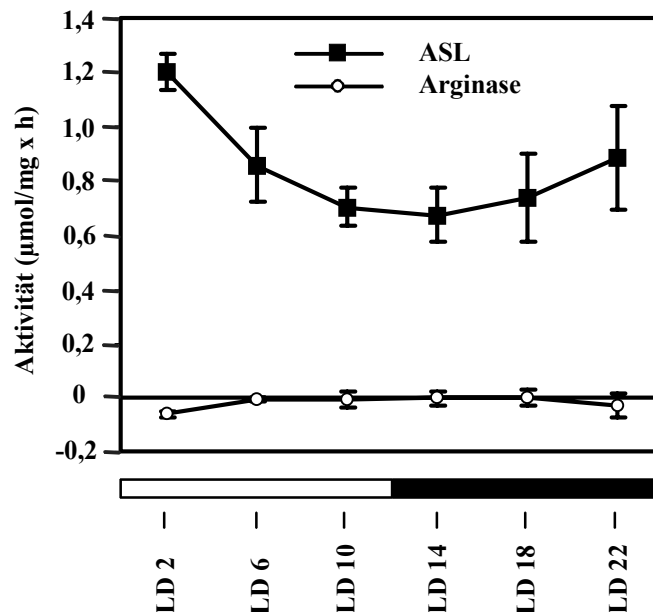


Abb. 29: Argininosuccinat-Lyase-Aktivität unter LD

C. reinhardtii-Zellen vom Stamm 137C wurden in einem Licht/Dunkelzyklus (LD-Zyklus) von 12:12 kultiviert. Ab zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase wurden alle vier Stunden Zellen geerntet und in Enzymtests die Aktivität der Argininosuccinat-Lyase (ASL) und der Arginase bestimmt. Die Kurve zeigt den gemittelten Wert von drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Der weiße Balken markiert den Tag und der schwarze die Nacht.

Es zeigte sich, daß die Aktivität der ASL einer deutlichen Tag/Nachtregulation unterliegt (Abb. 29). Zu Beginn des Tages (LD2) zeigt die ASL maximale Aktivität. Diese fällt bis zum Beginn der Nacht kontinuierlich ab und erreicht bei LD14 ihr Minimum. Gegen Ende der Nacht ist dann wieder ein Anstieg zu verzeichnen, der bereits als Hinweis auf eine circadiane Kontrolle gewertet werden kann. Eine signifikante Aktivität der Arginase ist zu allen Zeitpunkten praktisch nicht nachweisbar. Zu LD2 und LD22 ist sogar „negative Aktivität“ zu verzeichnen, was ein Anzeichen für eine Zunahme von Arginin ist; die Ursache hierfür ist in der Synthese von Arginin aus endogenem Argininosuccinat, das im Rohextrakt enthalten ist, zu sehen. Um zu überprüfen, ob die Aktivität der ASL nicht nur einer Licht/Dunkelregulation, sondern einer circadianen Regulation unterliegt, war jedoch ein zweiter Versuch mit Zellen, die unter konstanten

Bedingungen (LL) kultiviert worden waren, nötig. Diese wurden zunächst in einem LD-Zyklus synchronisiert und dann unter Dauerschwachlicht (LL) gesetzt. Da sich bei *C. reinhardtii* gegebenenfalls erst nach einem Tag unter Dauerschwachlicht eine deutliche Rhythmik zeigt, wurden die Zellen erst mit Beginn des zweiten Tages (ab LL26) geerntet. Die Beobachtung erfolgte über einen Zeitraum von 1½Tagen.

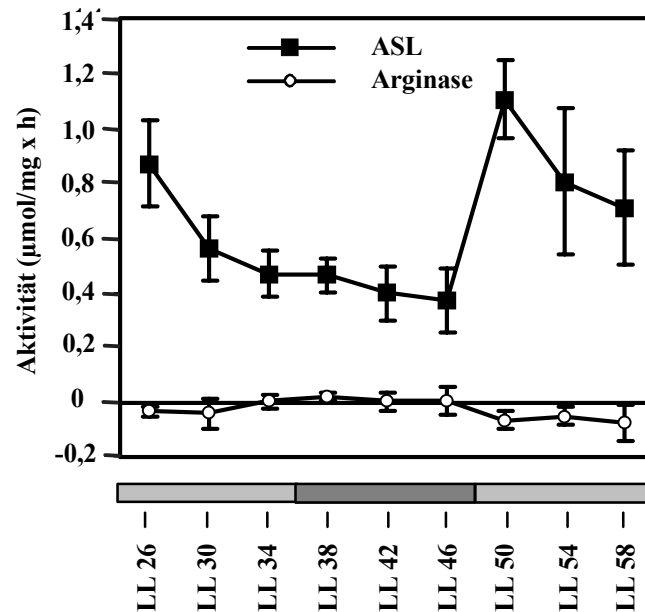


Abb. 30: Argininosuccinat-Lyase-Aktivität unter LL

C. reinhardtii-Zellen vom Stamm 137C wurden in einem LD-Zyklus (12:12) synchronisiert und dann unter Dauerschwachlicht gesetzt (= LL0). Nach 26 h Dauerschwachlicht wurden alle vier Stunden Zellen geerntet und in Enzymtests die Aktivität der Argininosuccinat-Lyase (ASL) und der Arginase bestimmt. Die Kurve zeigt die gemittelten Werte von drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Hellgraue Balken markieren den subjektiven Tag und dunkelgraue die subjektive Nacht.

Es zeigte sich, daß die ASL auch unter Dauerschwachlicht (LL) eine deutliche Tag/Nachtrhythmik beibehält (Abb. 30). Das Maximum der ASL-Aktivität liegt zu Beginn des subjektiven Tages (LL26) und fällt dann kontinuierlich bis zum Ende der subjektiven Nacht (LL46) ab. Mit Beginn des zweiten Tages (LL50) erreichte sie erneut ein Maximum, um daraufhin im Laufe des subjektiven Tages wieder abzufallen. Eine Arginase-Aktivität ist auch unter LL kaum nachweisbar. Offensichtlich hält also die innere Uhr eine circadiane Rhythmik in der ASL-Aktivität aufrecht. Es fällt auf, daß im Gegensatz zur Regulation unter LD, die

Aktivität unter LL in den vier Stunden, die den Übergang von Nacht zu Tag markieren, vom Minimalwert auf den Maximalwert ansteigt; die Amplitude ist dabei unter LL sogar noch ausgeprägter als unter LD. Die Periode der Schwingung bleibt unter Dauerschwachlicht jedoch offenbar bei ~24 h.

Setzt man die Enzymaktivität in Bezug zur Bindeaktivität von CHLAMY 1 (Abb. 2), so zeigt sich, daß zum Zeitpunkt der höchsten Bindeaktivität von CHLAMY 1 (LD10-14 bzw. LL42) die Aktivität der ASL minimal ist. Umgekehrt ist zu LD2 bzw. LL22-26 und LL50-54 die CHLAMY 1-Bindeaktivität minimal, während die ASL-Aktivität ihr Maximum erreicht. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß CHLAMY 1 als Repressor der Translation von *arg7* fungieren könnte. Ergebnisse eines *in vitro* TranslationsExperiments mit einem *gus*-Reportergen untermauern diese Folgerung (Schneid, 2002).

3.8.2 Circadiane Regulation der *arg7*-mRNS

In circadianen Systemen erfolgt die Regulation sehr häufig über die spezifische mRNS-Menge, ein Prinzip für das auch in *C. reinhardtii* schon zahlreiche Beispiele beschrieben sind (s. 1.4). Um zu klären, ob diese Form der Regulation auch für die ASL zutrifft, war es daher nötig, eine Quantifizierung der *arg7*-mRNS unter LD und LL vorzunehmen.

3.8.2.1 Semiquantitative RT-PCR

Da die *arg7*-mRNS nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird (Debuchy *et al.*, 1989), wurde entschieden, ihre Quantifizierung über eine RT-PCR vorzunehmen. Durch die exponentielle Amplifikation in der PCR ist der Nachweis weniger Kopien eines Matrizemoleküls möglich, sodaß die Empfindlichkeit um mehrere Größenordnungen höher liegt als z. B. bei einer „Northern“-Hybridisierung (Innis und Gelfand, 1990).

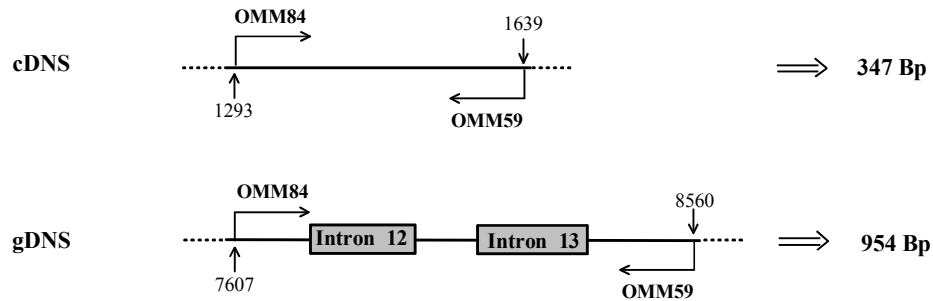
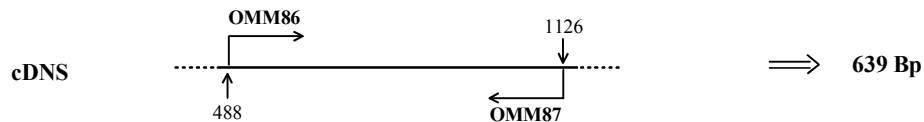
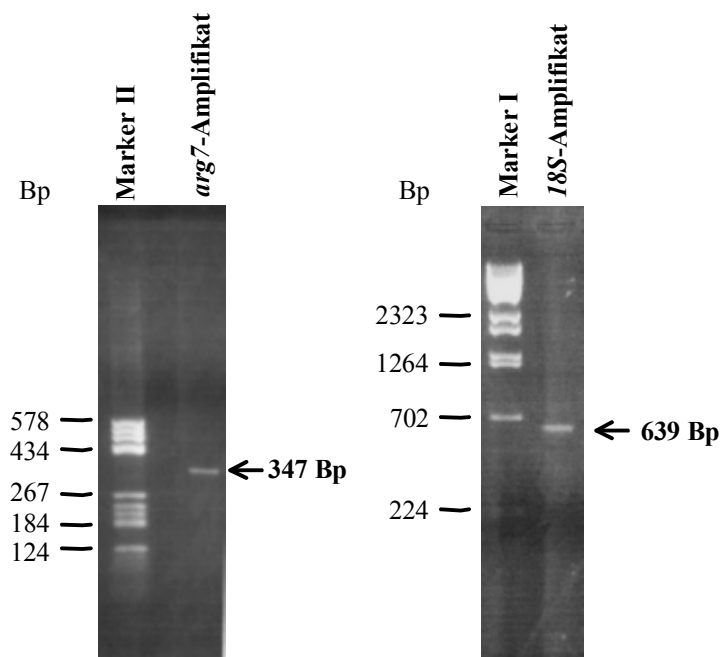
Im ersten Schritt sollte die mRNS mithilfe eines genspezifischen Reversen-Oligonukleotids und der Reversen Transkriptase in eine cDNS umgeschrieben

werden. Als Matrize in die PCR eingesetzt, konnte dann, durch Zugabe eines genspezifischen Sinn-Oligonukleotids, das definierte cDNS-Fragment amplifiziert werden. Um die Quantifizierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander in Relation zu setzen war es unerlässlich, daß parallel eine zweite, konstitutiv exprimierte, mRNA als interne Kontrolle mitamplifiziert wurde. Die zu diesem Zweck am häufigsten als interne Standards verwendeten mRNA sind die von „housekeeping“-Genen wie die der GAP-DH und des α -Actin. Beide sind jedoch ungeeignet bei Untersuchungen zur circadianen Rhythmik: eigene Versuche ergaben (nicht gezeigt), daß die mRNA der GAP-DH Tag/Nachtreguliert ist; und eine Analyse des Promotors des α -Actin-Gens zeigte eine hohe Homologie zu dem des circadian regulierten β -Tubulin. Da in *C. reinhardtii* noch keine mRNA beschrieben wurde die unter LD- und LL-Bedingungen konstitutiv exprimiert wird, wurde als interner Standard die *18S*-rRNA gewählt, die unter allen Bedingungen ein sehr gleichmäßiges Expressionsmuster zeigt.

3.8.2.1.1 Etablierung der PCR

C. reinhardtii Zellen (cw15) aus einem LD- und einem LL-Zyklus wurden alle vier Stunden geerntet und die RNS mit „Trizol®Reagent“ bzw. „PeqGOLD RNAPure™“ (s. 2.2.7.2) isoliert.

Für die Reverse Transkription (s. 2.2.11.6.1) wurden bei *arg7* 2,0 μ g und bei *18S* 0,1 μ g RNS zusammen mit dem Reversen-Oligonukleotid (OMM59 bzw. OMM87) eingesetzt (Abb. 31 A). Die Amplifikation mit den zugehörigen Sinn-Oligonukleotiden erfolgte für beide Fragmente mit einer „touchdown“-PCR (s. 2.2.11.4) von 62°C bis 58°C (in drei Zyklen) bei *arg7* und von 72°C bis 69°C (in sechs Zyklen) bei *18S*. Der PCR-Ansatz für *arg7* enthielt außerdem den 7-deaza-dGTP Mix und 2,5 % DMSO. Amplifiziert wurden bei *arg7* (mit OMM84) ein 347 Bp-Fragment und bei *18S* (mit OMM86) ein 639 Bp-Fragment (Abb. 31 A und B).

A**arg7-Amplifikation****18S-Amplifikation****B****Abb. 31: PCR-Amplifikate für die Quantifizierung der *arg7*-mRNS und der *18S*-mRNS**

(A) Ausgewählte Oligonukleotid-Paare zur Vervielfältigung des *arg7*- und *18S*-Amplifikats. Da die *arg7*-Oligonukleotide zwei Intron-Grenzen überspannen, führt eine Amplifikation durch eine etwaige Kontamination der RNS mit genomische DNS (gDNS) zu einem deutlich größeren Produkt (954 Bp). Angegeben ist die Position der Oligonukleotide in der cDNS- bzw. gDNS-Sequenz sowie die Größe der amplifizierten Fragmente. (B) Gelelektrophorese der Produkte aus der RT-PCR mit dem Oligonukleotid-Paar für *arg7* bzw. *18S*. Von einer RNS (LD2) wurden 200 ng (*arg7*) bzw. 10 ng (*18S*) in eine RT-PCR mit 26 (*arg7*) bzw. 31 (*18S*) Zyklen eingesetzt.

Um eine fehlerhafte Quantifizierung des *arg7*-Transkripts durch Kontaminationen mit genomischer DNS (gDNS) zu vermeiden, wurden die beiden Oligonukleotide so gewählt, daß sie zwei Intron-Grenzen überspannten. Ein Amplifikationsprodukt, das von gDNS herrührt, konnte somit durch seine Größe von 954 Bp leicht von dem cDNS-Amplifikat (347 Bp) unterschieden werden (Abb. 31 A). Diese Methode konnte bei *18S* nicht angewandt werden, da die Lage der Introns in diesem Gen nicht bekannt war. Zur Sicherheit mußte daher die verwendete mRNA auf gDNS-Kontaminationen untersucht werden. Dazu wurde mit einem Aliquot jeder RNS-Präparation ohne vorherige Reverse Transkription eine PCR durchgeführt. Da sich nach Elektrophorese der Ansätze in keinem Fall ein Amplifikationsprodukt zeigte (Abb. 32), war sichergestellt, daß die RNS-Präparationen frei von gDNS waren und somit für eine zuverlässige Quantifizierung der mRNA geeignet waren.

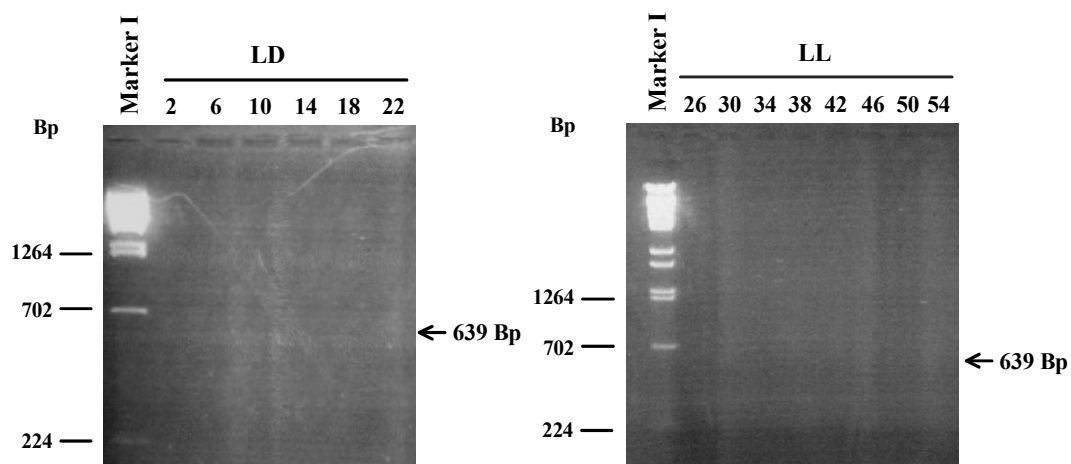


Abb. 32: Überprüfung der RNS-Präparationen auf Kontamination durch gDNS

Je 20 ng RNS aus Zellen eines LD- und LL-Zyklus wurden als Matrize in eine PCR mit dem *18S* Oligonukleotid-Paar eingesetzt. Nach 31 Zyklen wurden die Reaktionen gestoppt und die Proben wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Position (639 Bp) der möglicherweise durch gDNS-Kontamination generierten Amplifikate ist durch einen Pfeil markiert.

Nachdem die Bedingungen für die RT-PCR mit beiden Genen ausgearbeitet worden waren, konnte die Bestimmung des exponentiellen Bereichs der Amplifikation erfolgen. Dazu wurden bei *arg7* 20-36 PCR-Zyklen und bei *18S* 14-30 PCR-Zyklen durchgeführt. Um eine möglichst genaue Quantifizierung der

amplifizierten DNS vornehmen zu können wurde in der PCR [α - 32 P]dCTP zur Markierung der DNS eingesetzt (s. 2.2.11.5). So konnte nach der Analyse auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel (s. 2.2.6.3) die Intensität der Banden über einen Phosphoimager (s. 2.2.14) ausgewertet werden.

Bei *arg7* erfolgte die exponentielle Amplifikation bis zu 32 Zyklen (Abb. 33), danach war ein deutliches Abflachen der Kurve mit dem Eintritt in die stationäre Phase zu verzeichnen. Als optimale Bedingungen für eine Quantifizierung von *arg7* wurde eine Zyklenzahl von 22 ausgewählt, da so der lineare Zusammenhang in der Amplifikation gewährleistet war. Für die PCR mit der *18S*-RNS zeigte sich bis zu 28 Zyklen ein exponentieller Anstieg (Abb. 33), der bei 30 Zyklen dann in die stationäre Phase überging. Mit 18 PCR-Zyklen konnte hier eine optimale Quantifizierung im linearen Bereich erfolgen.

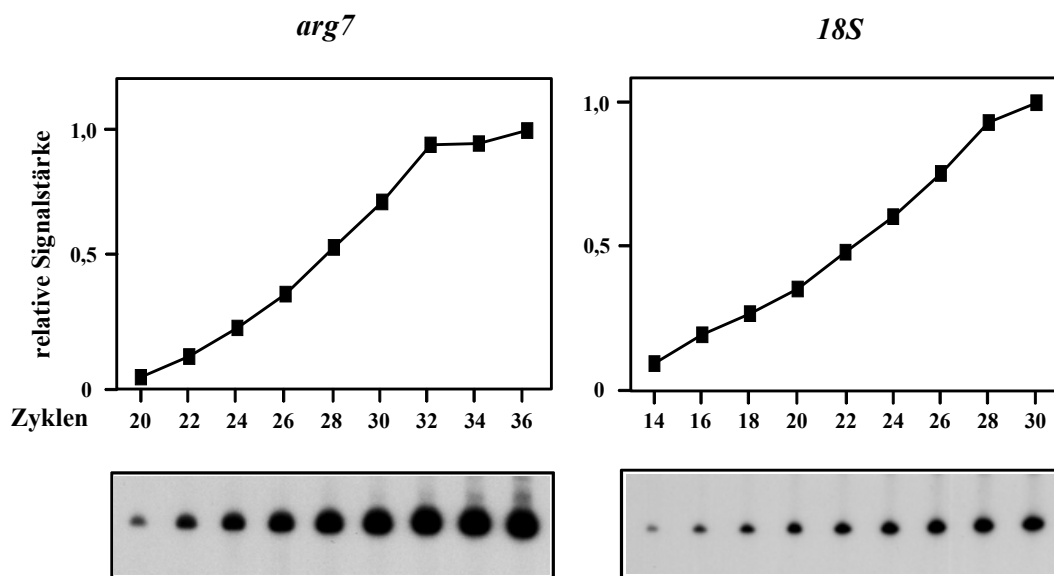


Abb. 33: Exponentielle Bereiche bei der Amplifikation von *arg7* und *18S*

Von beiden PCR-Reaktionen wurde ein Mehrfachansatz mit RNS zu LD2 und [α - 32 P]dCTP gemacht und auf neun PCR-Gefäße verteilt. Die Amplifikation erfolgte mit dem jeweiligen Programm bei 36 (*arg7*) bzw. 30 (*18S*) Zyklen. Nach Ablauf von 20 (*arg7*) bzw. 14 (*18S*) Zyklen wurde immer im Abstand von zwei Zyklen eine Probe aus dem Thermocycler entnommen und die Reaktion gestoppt. Nach Abschluß der PCR wurden die Proben auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel analysiert und die Signalstärken mithilfe eines Phosphoimagers quantifiziert.

3.8.2.1.2 Quantifizierung der RNS

Zunächst wurde eine semiquantitative RT-PCR mit RNS aus Zellen, die in einem LD-Zyklus kultiviert worden waren, durchgeführt. Nach reverser Transkription wurden in der PCR, unter Einbau von ^{32}P -markiertem dCTP, das *arg7*-Fragment mit 22 Zyklen und das *18S*-Fragment mit 18 Zyklen exponentiell amplifiziert.

Die Quantifizierung des internen Standard *18S* zeigte über den gesamten LD-Zyklus ein nahezu gleich starkes Amplifikationssignal (Abb. 34 A). Daraus ließ sich schließen, daß in allen 6 LD-Proben die eingesetzten RNS-Mengen und die Amplifikationseffizienzen keine große Varianz zeigten. Nach Korrektur, der für *arg7* ermittelten Signalstärken (Abb. 34 A), um die *18S*-Werte ergab sich der in Abb. 34 B dargestellte Verlauf. Danach zeigt die *arg7*-mRNS über einen Tag/Nachtzyklus zwei Maxima. Im Laufe der Nacht ist ein kontinuierlicher Anstieg bis zum Maximum bei LD2-LD22 zu beobachten. Danach nimmt ihre Aktivität zu LD6 zunächst ab, ehe nach einem zweiten Anstieg zu LD10 schließlich bei LD14 das Minimum erreicht wird. Die Amplitude der Schwingung liegt mit einem Faktor von ~ 2 relativ niedrig.

A

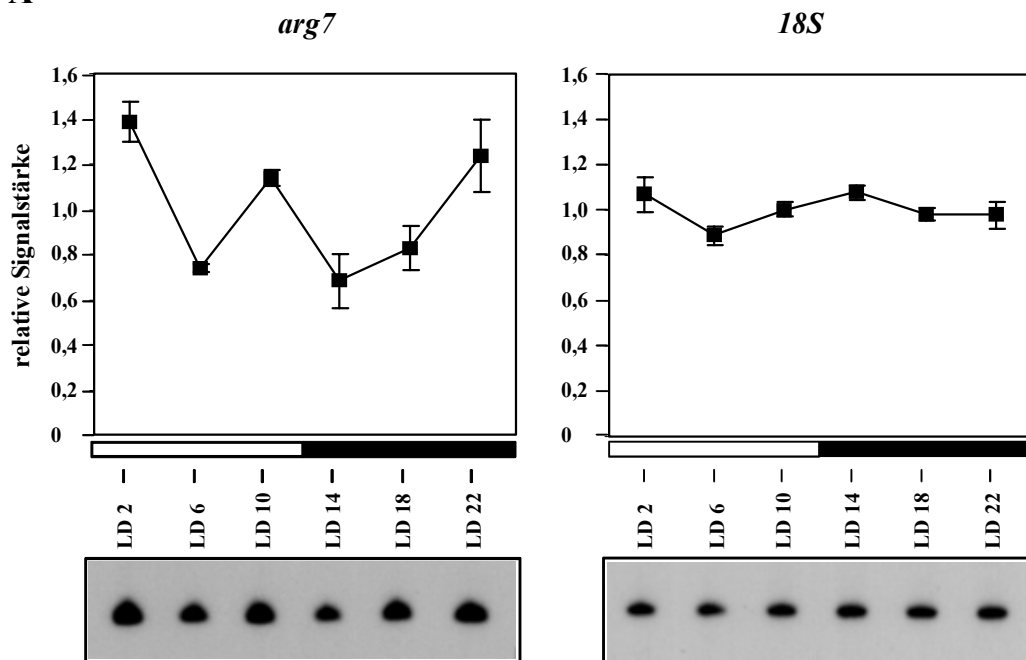


Abb. 34

B

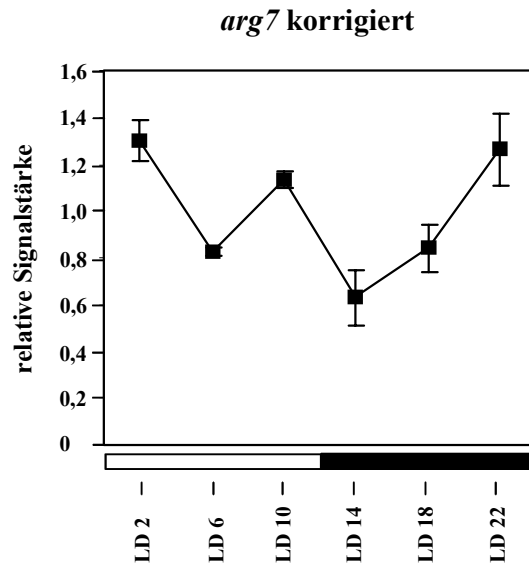


Abb. 34: Semiquantitative RT-PCR von *arg7* unter LD

(A) *C. reinhardtii*-Zellen vom (Stamm cw15) wurden unter LD kultiviert. Über einen Tag wurden alle vier Stunden Zellen geerntet und die RNS zur Quantifizierung der *18S*- bzw. *arg7*-mRNS in eine RT-PCR eingesetzt. Exponentielle Amplifikation erfolgte für *arg7* mit 22 Zyklen und für *18S* mit 18 Zyklen. Zur Bestimmung der relativen Mengen synthetisierter Moleküle wurde den Reaktionsansätzen [α - 32 P]dCTP zugesetzt. Nach der Amplifikation wurde die DNS auf einem Polyacrylamidgel (5 %) aufgetrennt und die Intensität der jeweiligen Bande über einen Phosphorimager ausgewertet. Die Kurven zeigen den Mittelwert aus vier voneinander unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Unter den Graphen ist das Autoradiogramm jeweils eines Experiments dargestellt. (B) Die Signalstärken von *arg7* wurden um die des internen Standard *18S* korrigiert.

Die Bestimmung der *arg7* und *18S*-mRNS-Menge von Zellen, die nach ihrer Synchronisation unter konstanten Bedingungen (LL) kultiviert worden waren, erfolgte über einen Zeitraum von 1½Tagen. Die Quantifizierung der mRNS-Menge des internen Standard *18S* zeigte über den beobachteten Zeitraum nur geringfügige Schwankungen (Abb. 35 A), während bei *arg7* zwei deutliche Maxima zu erkennen waren.(Abb. 35 A). Eine Korrektur dieser Werte um die *18S*-Werte ergab den in Abb. 35 B dargestellten Verlauf. Die Maxima der *arg7*-mRNS finden sich demnach zu Beginn des subjektiven Tages (LL26 bzw. LL50) und in der Mitte der subjektiven Nacht (LL42), während das absolute Minimum gegen Ende der subjektiven Nacht (LL46) erreicht wird. Die Amplitude der Schwingungen liegt auch hier mit einem Faktor von ~2 wieder relativ niedrig.

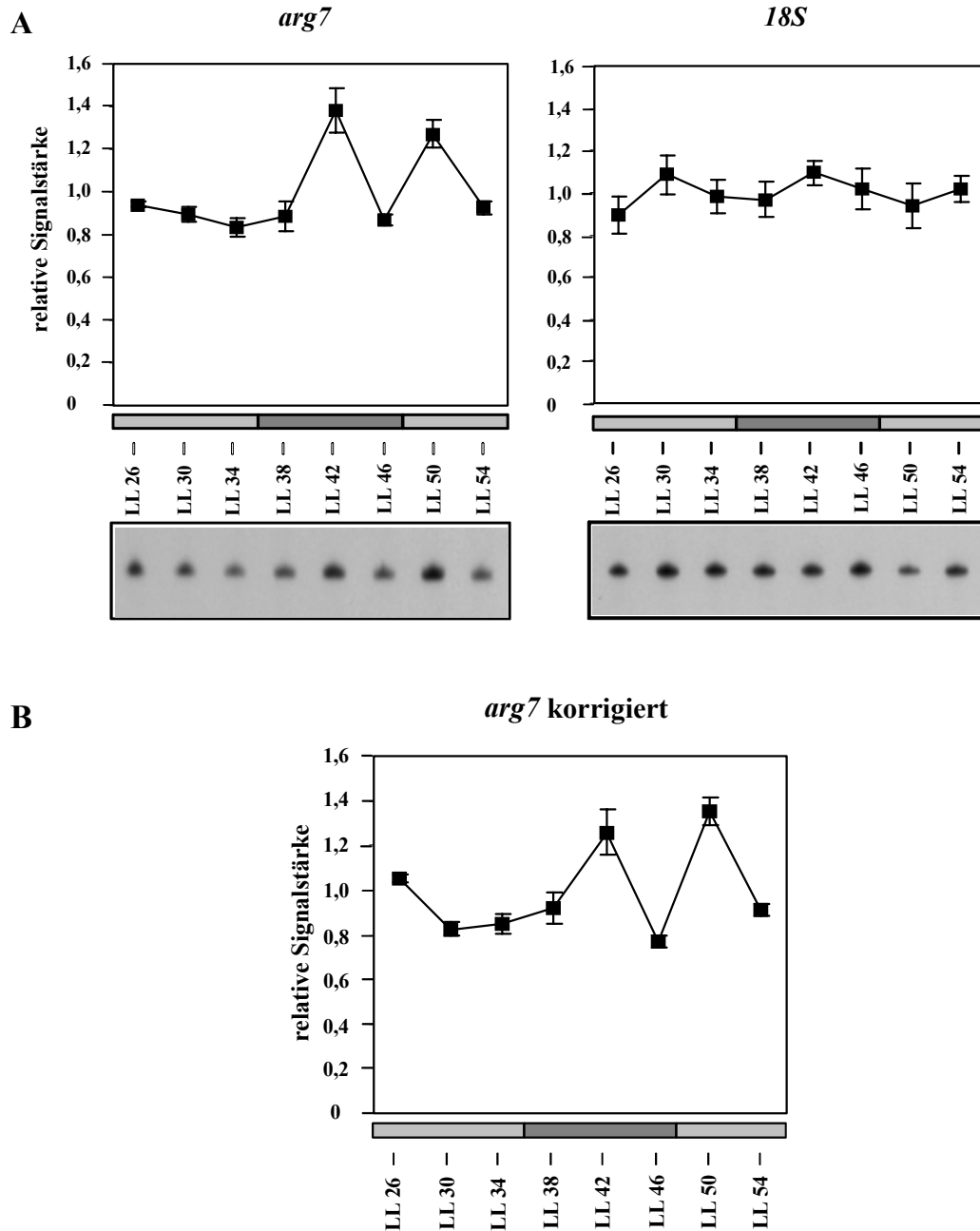


Abb. 35: Semiquantitative RT-PCR von *arg7* unter LL

(A) *C. reinhardtii*-Zellen vom Stamm cw15 wurden unter LL kultiviert. Über 26 h wurden alle vier Stunden Zellen geerntet und die RNS zur Quantifizierung der *18S*- bzw. *arg7*-mRNS in eine RT-PCR eingesetzt. Exponentielle Amplifikation erfolgte für *arg7* mit 22 Zyklen und für *18S* mit 18 Zyklen. Zur Bestimmung der relativen Mengen synthetisierter Moleküle wurde den Reaktionsansätzen [α - 32 P]dCTP zugesetzt. Nach der Amplifikation wurde die DNS auf einem Polyacrylamidgel (5 %) aufgetrennt und die Intensität der jeweiligen Bande über einen Phosphorimager ausgewertet. Die Kurven zeigen den Mittelwert aus vier voneinander unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Unter den Graphen ist das Autoradiogramm jeweils eines Experiments dargestellt. (B) Die Signalstärken von *arg7* wurden um die des internen Standard *18S* korrigiert.

Die Daten zeigen, daß die Expression der *arg7*-mRNS nicht nur im Licht/Dunkelwechsel, sondern auch unter konstanten Bedingungen einer Regulation unterliegt, die jedoch offenbar nicht sehr stark ausgeprägt ist, da sich niedrigstes und höchstes mRNS-Niveau jeweils nur um den Faktor ~ 2 unterscheiden; damit liegt sie aber auch in der gleichen Größenordnung wie die Schwankung der Enzymaktivität. Auffällig ist, daß sich das Expressionsmuster der *arg7*-mRNS unter LD und LL sehr unterschiedlich verhält, und auch eine Korrelation zu den jeweiligen Enzymaktivitäten (Abb. 29 u. Abb. 30) ist weder unter LD noch unter LL zu erkennen. Es wurde daher entschieden, die Ergebnisse aus der semiquantitativen RT-PCR durch eine Quantifizierung über eine „Northern“-Hybridisierung zu überprüfen.

3.8.2.2 Quantifizierung durch „Northern“-Hybridisierung

Ein Vorversuch zum Nachweis der *arg7* mRNS über eine „Northern“-Hybridisierung von gesamt-RNS verlief erfolglos, da die *arg7*-mRNS in *C. reinhardtii* in zu geringer Kopienzahl vorliegt. Auchincloss *et al.* (1999) berichteten jedoch über einen erfolgreichen Nachweis der *arg7*-mRNS in einer „Northern“-Hybridisierung mit der Poly(A)⁺-Fraktion der Gesamt-RNS. Es wurde daher entschieden, in großem Maßstab RNS aus Zellen eines LD- bzw. LL-Zyklus zu isolieren, daraus die Poly(A)⁺-RNS-Fraktion aufzureinigen und diese dann in einer „Northern“-Hybridisierung mit einer *arg7*-Sonde zu testen.

Um ein deutliches Hybridisierungssignal zu erzielen, sollte als Sonde ein möglichst langes Fragment der *arg7* cDNS kloniert werden. Dazu wurden zwei Oligonukleotide (OMM96 u. OMM97) ausgewählt, die die Vervielfältigung eines 1,43 kB Fragment aus der 1,64 kB langen cDNS ermöglichen sollten (Abb. 36 A). Als Matrize für die PCR diente cDNS (LD10). Auch nach zahlreichen Optimierungsschritten, dem Einsatz der *Pfx* Heißstart-Polymerase (s. 2.2.11.3) und eines „touchdown“-Protokolls (s. 2.2.11.4) von 62°C bis 58°C (in 5 Zyklen), war keine Amplifikation des Fragments ohne die Amplifikation weiterer, unspezifische Produkte möglich. Zur Sicherheit erfolgte daher eine Überprüfung

der Identität des avisierten Amplifikats durch „Southern“-Hybridisierung mit dem ^{32}P -markierten *arg7* RNS-Transkript von pHW24 (Abb. 36 A). Vorgegangen wurde nach dem Protokoll für „Northern“-Hybridisierung (s. 2.2.7.7), jedoch mit einer auf 58°C erniedrigten Hybridisierungstemperatur.

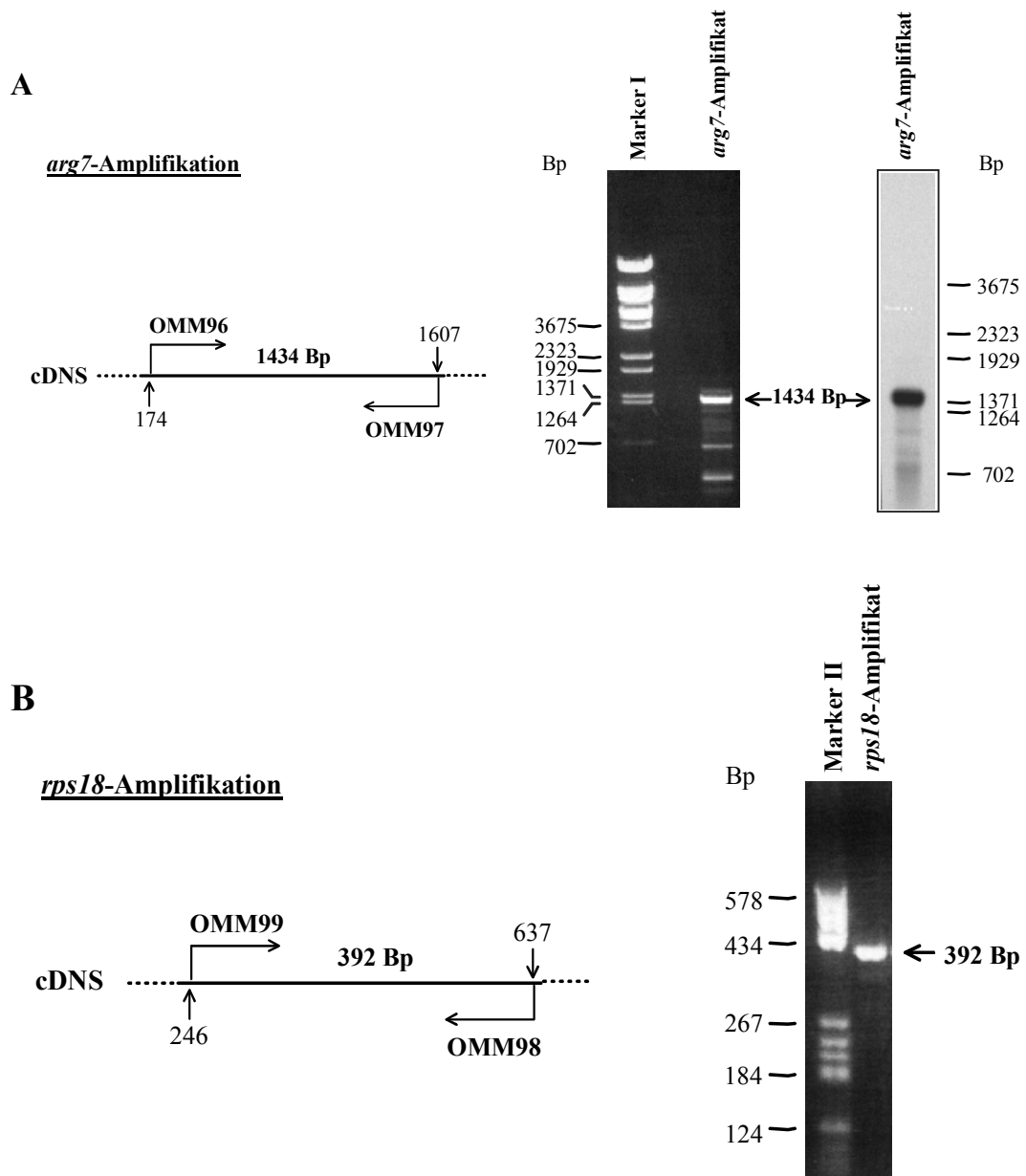


Abb. 36: Amplifikation der *arg7*- und *rps18*-Sonden

(A) Mit dem Oligonukleotid-Paar OMM96/ OMM97 wurde aus der *arg7* cDNS ein 1434 Bp-Fragment amplifiziert. Zur Kontrolle auf die Identität wurde es in einer „Southern“-Hybridisierung mit dem radioaktiven Transkript von pHW24 (*arg7* 3'-UTR) getestet. (B) Mit dem Oligonukleotid-Paar OMM98/ OMM99 wurde aus der *rps18* cDNS ein 392 Bp-Fragment amplifiziert.

Nach Elution aus dem Gel und nachfolgender Ligation des Fragments in pBluescript KS+ (s. 2.2.12.4 u. 2.2.12.5) wurde das resultierende Plasmid (pHW44) durch eine spezifische Restriktionsanalyse nochmals überprüft. Durch einen Verdau mit *Bgl*I mußten bei Klonierung des 1434 Bp-Amplifikats Fragmente der Größe 1688 Bp, 1266 Bp, 842 Bp und 599 Bp entstehen (spezifische Fragmente sind unterstrichen). Die Restriktionsanalyse (Abb. 37) verifizierte die Identität des klonierten Fragments.

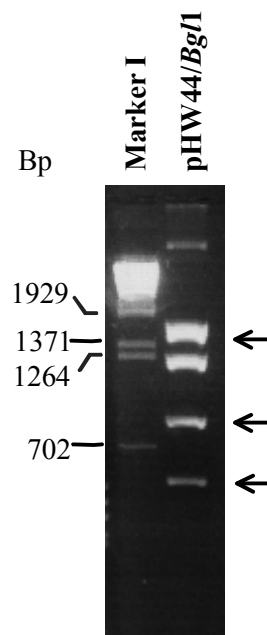


Abb. 37: Kontrollverdau des Plasmids pHW44

Das Plasmid pHW44 wurde durch einen *Bgl*I-Verdau charakterisiert. Banden, die spezifisch für die Insertion des 1434 Bp-Fragments der *arg7* cDNS sind, sind durch Pfeile markiert.

Auch für die „Northern“-Hybridisierung war eine konstitutiv exprimierte, interne Kontrolle nötig. In diesem Fall konnte die *18S*-rRNS aber nicht als interner Standard verwendet werden, da sie in der Poly(A)⁺-Fraktion der RNS nicht enthalten ist. Stattdessen wurde die mRNA des ribosomalen Protein S18 (*rps18*) ausgewählt. Wurde die *18S*-rRNS konstitutiv exprimiert, so war dies zwar auch für die mRNA des ribosomalen Proteins S18 (*rps18*) zu erwarten, bedurfte jedoch noch einer vorherigen Untersuchung.

Mithilfe der *Pfx* Heißstart-Polymerase (s. 2.2.11.3) wurde aus der 774 Bp-langen cDNS des *rps18*-Gens mit dem Oligonukleotid-Paar OMM98/OMM99 ein

392 Bp-Fragment amplifiziert und in pBluescript KS+ ligiert (pHW43, Abb. 36 B). Zur Überprüfung der Identität des klonierten Fragments wurde ein Kontrollverdau mit *Sal*I durchgeführt. Die Größen der zu erwartenden Fragmente waren 3024 Bp und 328 Bp. Die Restriktionsanalyse (Abb. 38) bestätigte die Identität des klonierten Fragments.

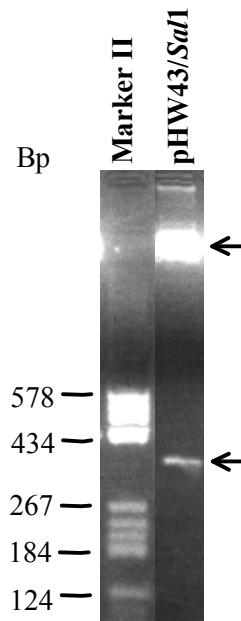


Abb. 38: Kontrollverdau des Plasmids pHW43

Das Plasmid pHW43 wurde durch einen *Sal*I-Verdau charakterisiert. Banden, die spezifisch für die Insertion des 392 Bp-Fragment der *rps18* cDNS sind, sind durch Pfeile markiert.

Um sicherzustellen, daß *rps18* konstitutiv exprimiert wird, sollte das mRNS-Niveau über einen LD-Zyklus bestimmt werden. Dazu wurden zwei „Northern“-Transfers (s. 2.2.6.5) mit gesamt-RNS aus Zellen, die unter LD kultiviert worden waren, zunächst mit der *rps18*-Sonde und daraufhin mit der *18S*-Sonde (pHK18S4) hybridisiert (s. 2.2.7.7). Wurde *18S* als interne Ladekontrolle herangezogen und seine Signalstärke mit der von *rps18* verrechnet, so zeigte sich, von einer leichten Abnahme gegen Ende der Nacht abgesehen, über den Tag/Nachtverlauf eine relativ gleichmäßige Expression der *rps18*-mRNS (Abb. 39). Unter Berücksichtigung dieser geringen Schwankungen konnte die *rps18*-mRNS also als interner Standard verwendet werden.

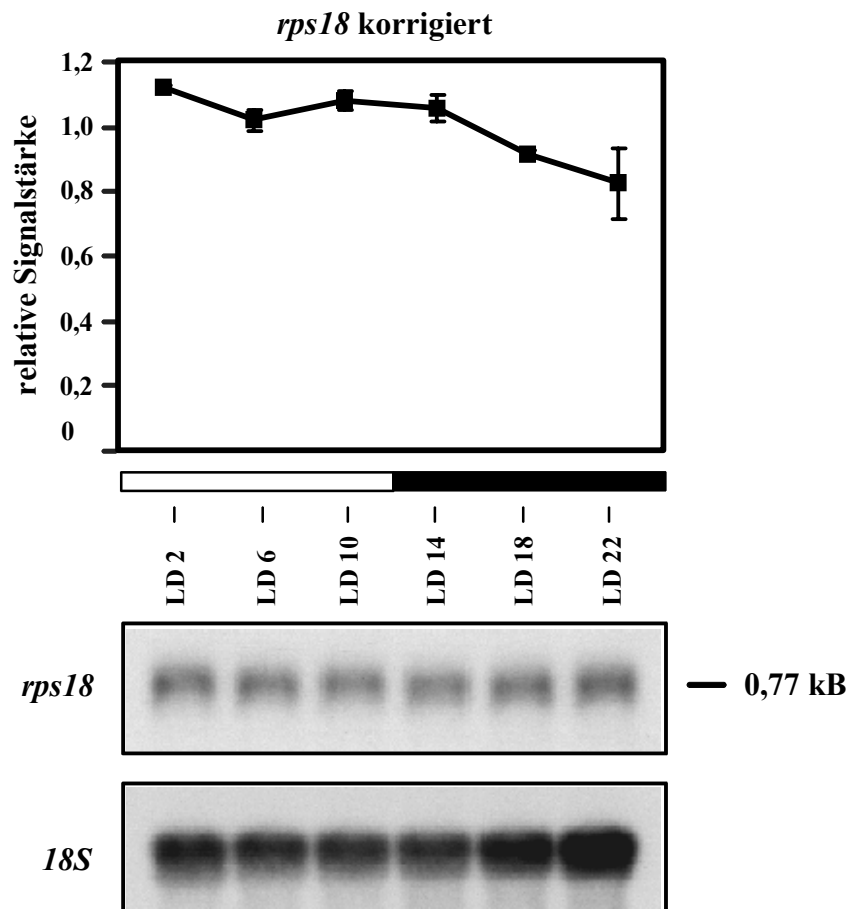


Abb. 39: „Northern“-Hybridisierung mit der *rps18*-Sonde

C. reinhardtii-Zellen vom Stamm cw15 wurden in einem Licht/Dunkelzyklus (LD-Zyklus) von 12:12 kultiviert. Ab zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase wurden alle vier Stunden Zellen geerntet und RNS isoliert. Je Zeitpunkt wurden 10 µg RNS aufgetragen. Die Membran wurde zunächst mit der 32 P-markierten *rps18*-Sonde hybridisiert. Die ermittelten Signalstärken konnten dann mit denen aus einer Hybridisierung mit der *18S*-Sonde (= interne Kontrolle) verrechnet werden. Die Daten der quantitativen Auswertung sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben jeweils den höchsten und niedrigsten Wert an. Die Kurve zeigt die relative Menge an *rps18*-mRNS nach Verrechnung mit *18S* an. Exemplarisch ist jeweils ein Hybridisierungs-Experiment dargestellt.

Ein „Northern-blot“ mit Poly(A)⁺RNS aus Zellen eines LD-Zyklus wurde daraufhin zunächst mit der Sonde gegen *arg7* und dann mit der *rps18*-Sonde hybridisiert (Abb. 40) Nach Korrektur der Signalstärken von *arg7* um die des internen Standards *rps18* zeigte sich, daß die *arg7*-mRNS von Beginn bis Mitte des Tages (LD2-LD6) ihr Minimum hat, um am Ende des Tages anzusteigen, das Maximum wird gegen Mitte der Nacht (LD18) erreicht. Die Amplitude der

Schwingung ist mit einem Faktor von $\sim 1,7$ so gering, daß nur von einer sehr schwachen transkriptionalen Regulation ausgegangen werden kann.

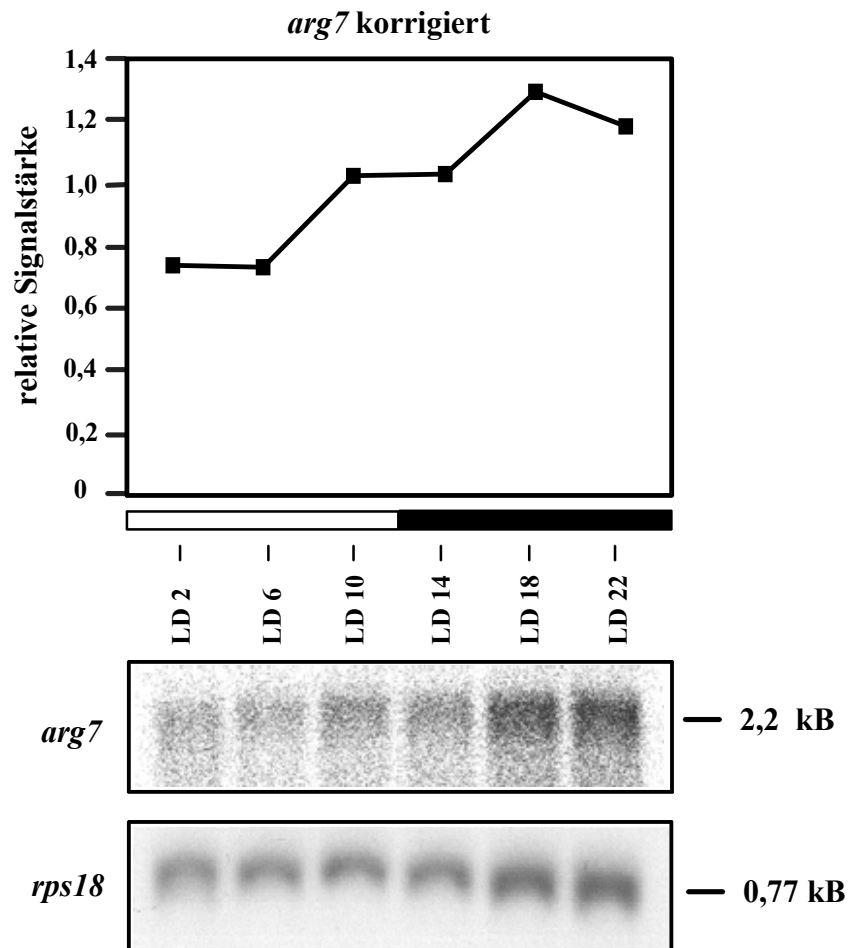


Abb. 40: „Northern“-Hybridisierung mit der *arg7*-Sonde

C. reinhardtii-Zellen vom Stamm cw15 wurden in einem Licht-Dunkel-Zyklus (LD-Zyklus) von 12:12 kultiviert. Ab zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase wurden alle vier Stunden Zellen geerntet und Poly(A)⁺-RNS isoliert. Je Zeitpunkt wurden 4 µg Poly(A)⁺-RNS aufgetragen. Die Membran wurde zunächst mit der ³²P markierten *arg7*-Sonde hybridisiert. Die ermittelten Signalstärken konnten dann mit denen aus einer Hybridisierung mit der *rps18*-Sonde (= interne Kontrolle) verrechnet werden. Der Graph zeigt die relative Menge an *arg7*-mRNA nach Verrechnung mit *rps18* an.

Das Ergebnis aus der Quantifizierung der *arg7*-mRNA unter LD durch eine „Northern“-Hybridisierung steht somit in deutlichem Widerspruch zu den Ergebnissen aus der semiquantitativen RT-PCR, die ein Maximum bei LD22-LD2 und ein weiteres bei LD10 zeigte. Auch zum Verlauf der ASL-Aktivität im LD-

Zyklus läßt sich nur schwer eine Korrelation erkennen, da die Maxima der beiden Schwingungen eine Phasenverschiebung von ca. 8 h zeigen.

Analog wurde auch eine „Northern“-Hybridisierung mit Poly(A)⁺RNS aus Zellen eines LL-Zyklus durchgeführt. Die Analyse der Hybridisierungssignale zeigte jedoch, daß die RNS im Laufe des Experiments degradiert worden war und dadurch eine quantitative Auswertung nicht mehr möglich war.

Es konnte somit nicht geklärt werden, ob die Expression der *arg7*-mRNS sowohl im Tag/Nachtwechsel, als auch unter konstanten Bedingungen einer Regulation unterliegt, und ob diese Regulation, sofern vorhanden, circadian ist.

3.9 Regulation der ASL in einem *arg7*(-UG)-transformierten Stamm

Um direkt zu zeigen, ob CHLAMY 1 durch seine Bindung an die „UG“-Repetition eine circadiane Kontrolle ausübt, wurde ein *in vivo*-Testsystem mit der ASL ausgearbeitet. Arginin auxotrophe *C. reinhardtii*-Stämme mit einem Defekt im *arg7*-Gen wurden bereits seit längerem erfolgreich mit Plasmiden, die das *arg7*-Gen enthalten, transformiert und konnten so in ihrer ASL-Aktivität wieder komplementiert werden (Debuchy *et al.*, 1989). Durch Mutagenese der „UG“-Repetition im 3'-UTR des *arg7*-Gens und nachfolgende Transformation in einen *arg7*-Stamm sollte es somit möglich sein, die Bedeutung dieses Motivs für die circadiane Regulation zu untersuchen. Als Positivkontrolle sollte ein mit dem Wildtyp-Gen transformierter Stamm dienen.

3.9.1 Struktur des *arg7*-Gens in pJD67

Zur Komplementierung der ASL-Aktivität eignet sich sowohl das *arg7*-Gen (Debuchy *et al.*, 1989), als auch seine cDNS (Auchincloss *et al.* 1999). Da ein cDNS-Klon zum Zeitpunkt der beschriebenen Untersuchungen noch nicht zur Verfügung stand, sollte die Transformation mit einem Plasmid, das das *arg7*-Gen enthält erfolgen.

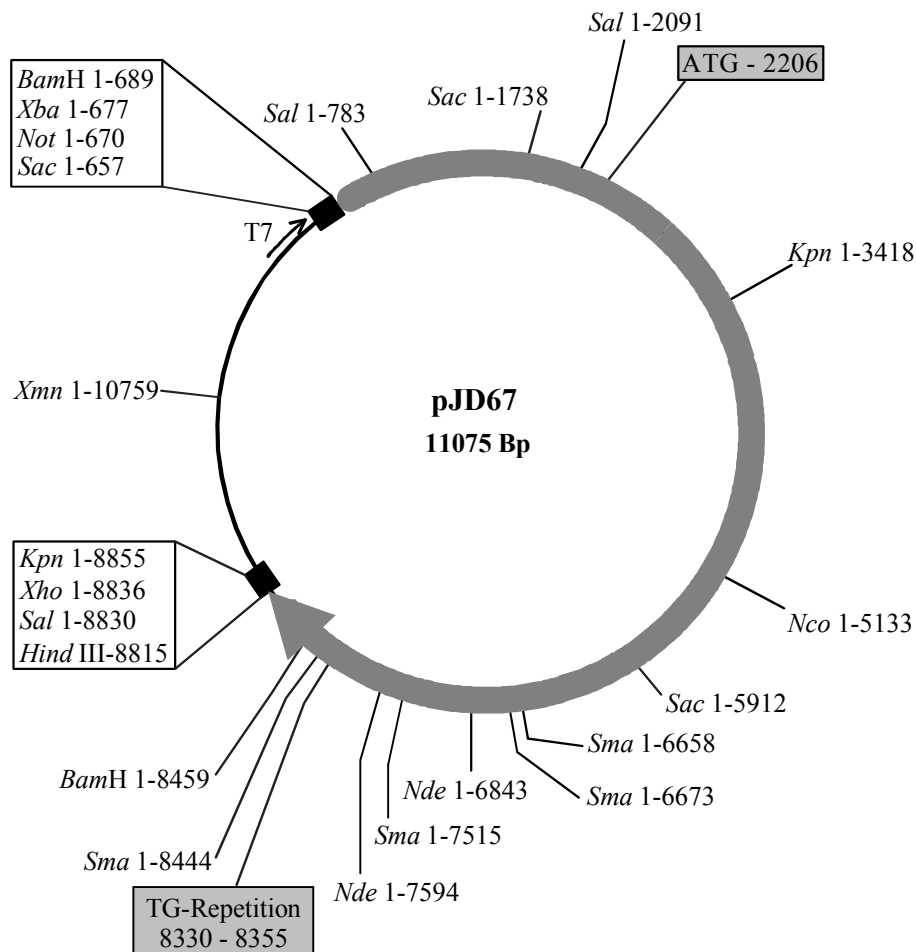
B

Abb. 41: Das *arg7*-Gen im Plasmid pJD67

(A) Struktur des *arg7*-Gens in pJD67. Die relevanten Elemente des Gens sind mit ihrer Basenposition im inserierten Fragment angegeben. Die Zahlen in Klammern entsprechen den jeweiligen Positionen in der Gensequenz (Acc. No. X16619). Am Ende des *arg7*-Fragments befindet sich noch ein Anhang von 352 Bp unbekannter Herkunft. (B) Durch eine Restriktionsanalyse gewonnene Karte des Plasmids pJD67.

Von John Davies wurde uns freundlicherweise das Plasmid pJD67 (Abb. 41) zur Verfügung gestellt, das das *arg7*-Gen enthält, welches ASL-defiziente Stämme wieder komplementieren kann. Das Plasmid enthält ein 8,1 kB Fragment, das die nahezu vollständige Sequenz, der für das *arg7*-Gen in „GenBank“ veröffentlichten Sequenz (Acc. No. X16619), umfaßt. Nach einer Restriktionsanalyse und teilweisen Sequenzierung des Plasmids ließ sich die in (Abb. 41 A) dargestellte Karte aufstellen. Dabei zeigte ein Vergleich mit der Gen- und cDNS-Sequenz, daß die vorderen ~905 Basen der genomischen Sequenz fehlten. Der 5'-UTR beginnt

bei Position 2413 der genomischen Sequenz (Auchincloss *et al.* 1999). Da der Umfang der Promotorregion von *arg7* noch nicht bestimmt worden war, blieb unklar, ob die verbleibenden 1228 Bp im inserierten Fragment den vollständigen Promotor enthalten. Am 3'-Ende fehlten etwa 468 Basen, jedoch waren die „TG“-Repetition und das Poly(A)-Signal noch vorhanden.

3.9.2 Mutagenese der UG-Repetition im 3'-UTR von *arg7*

Durch eine *in vitro*-Mutagenese nach Deng & Nickoloff (1992) (s. 2.2.9) sollten relevante Basen der „UG“-Repetition im 3'-UTR von *arg7* ausgetauscht werden. Das Mutagenese-Oligonukleotid wurde so gewählt, daß das zentrale (UG)₇-Motiv vollständig zerstört wurde (Abb. 42), wodurch eine weitere Bindung von CHLAMY 1 auszuschließen war.

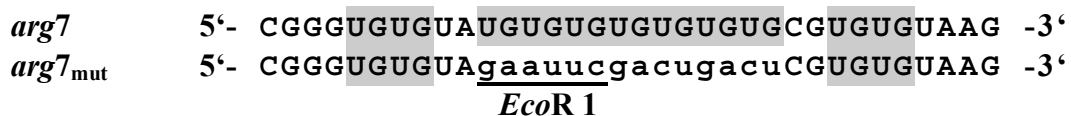


Abb. 42: *in vitro*-Mutagenese der „UG“-Repetition im *arg7* 3'-UTR

Durch eine *in vitro*-Mutagenese mit dem Oligonukleotid OMM77 wurden die zentralen sieben „UG“-Elemente im 3'-UTR von *arg7* ausgetauscht (kleine Buchstaben). Als Selektionsmarker wurde dabei eine Schnittstelle für *EcoR*1 eingeführt. „UG“-Elemente sind grau unterlegt.

Als problematisch für die Mutation erwies sich die Größe des Plasmids pJD67 von 11 kB. Eine erfolgversprechende Mutagenese war bei der angewandten Methode nur mit Plasmiden bis zu ~6 kB zu erwarten (Pharmacia). Aus diesem Grund war eine vorangehende Subklonierung des 3'-Endes von *arg7* unumgänglich. Zu diesem Zweck wurde durch einen *Hind*III/*Nde*I-Verdau ein, das 3'-Ende umfassendes, Fragment aus pJD67 ausgeschnitten und in den Vektor pUC19 ligiert (pHW30, Abb. 43). Nun konnte die Mutagenese erfolgen, in deren Verlauf eine *EcoR*1-Schnittstelle an Stelle der „UG“-Repetition eingeführt wurde (pHW31). Das subklonierte Fragment wurde wieder ausgeschnitten und in zwei weiteren Klonierungsschritten konnte das vollständige Plasmid pHW33 (≡

pJD67_{mut}) wieder hergestellt werden (Abb. 43). Durch einen Kontrollverdau mit *Eco*R1 wurde der Erfolg der Mutagenese überprüft. Wie Abb. 44 zeigt wurde pHW33 durch *Eco*R1 linearisiert, das Ausgangsplasmid pJD67 dagegen nicht.

Um sicherzustellen, daß CHLAMY 1 an den mutierten 3'-UTR nicht mehr binden konnte, wurde er mittels PCR aus dem Plasmid pHW33 amplifiziert (vergleiche auch Amplifikation des *arg*7_{wt} 3'-UTR, s. 3.5) und in pBluescript KS+ kloniert. Ein ³²P-markiertes Transkript davon wurde zusammen mit dem Wildtyp-Transkript im „mobility shift“-Experiment (s. 2.2.13.1.4) mit einem Proteinrohextrakt aus *C. reinhardtii* getestet. Dabei zeigte sich, daß noch eine geringe Bindeaktivität von CHLAMY 1 zum mutierten 3'-UTR vorhanden war (Abb. 45).

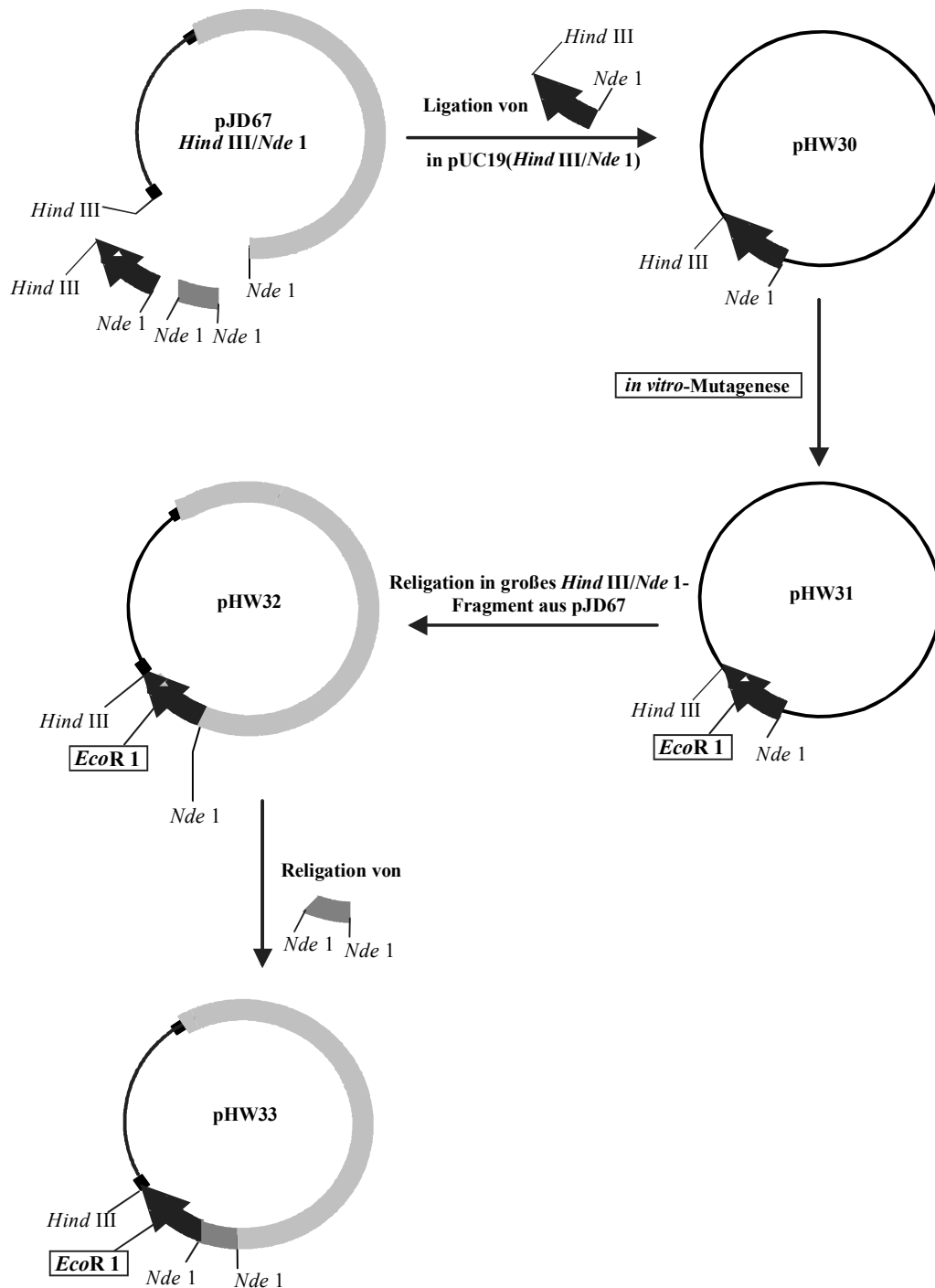


Abb. 43: Subklonierung eines pJD67 Fragments zur *in vitro*-Mutagenese

Durch einen *Hind*III/*Nde*I-Verdau wurde aus pJD67 das 3'-Ende des *arg7* Gens, das die „TG“-Repetition enthält, ausgeschnitten. Das Fragment wurde in den *Hind*III/*Nde*I verdauten pUC19-Vektor ligiert (pHW30). Daraufhin wurde durch eine *in vitro*-Mutagenese nach Deng und Nickoloff die „TG“-Repetition eliminiert und eine *Eco*R1-Schnittstelle eingeführt (pHW31). Das mutierte Fragment wurde wieder exzisiert und in das pJD67-Fragment religiert (pHW32). Abschließende Ligation des noch verbliebenen *Nde*I/*Nde*I-Fragments stellte wieder das vollständige Plasmid her (pHW33).

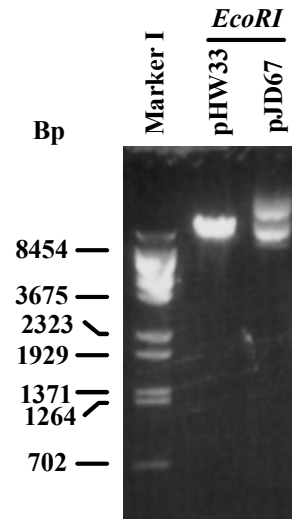


Abb. 44: Gelelektrophorese eines Kontrollverdau des Plasmids pHW33

Das Plasmid pHW33 wird, im Gegensatz zu pJD67, durch einen Verdau mit *EcoRI* linearisiert.

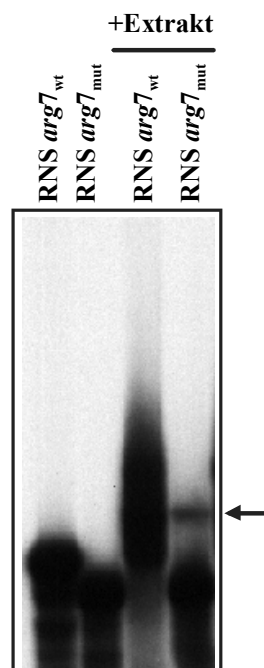


Abb. 45: „mobility shift“-Experiment mit dem mutierten *arg7* 3'-UTR

Mit dem Oligonukleotid-Paar OMM51/OMM64 und pHW33 als Matrize wurde der *arg7*_{mut} 3'-UTR amplifiziert (vergleiche auch Amplifikation des *arg7*_{wt} 3'-UTR). Nach Klonierung des Fragments in pBluescript KS+ wurde vom T7-Promotor ein ³²P-markiertes Transkript synthetisiert und im „mobility shift“-Experiment mit einem Proteinrohextrakt aus *C. reinhardtii* getestet. Der Pfeil markiert den „shift“ mit dem *arg7*_{wt}- und *arg7*_{mut}-Transkript.

Um die Bindung von CHLAMY 1 vollends zu eliminieren mußte daher eine weitere Mutation durchgeführt werden. Eine Analyse der flankierenden Bereiche zeigte, daß sich 5' der mutierten Sequenz, neben den zwei verbliebenen „UG“-Elementen, noch ein Abschnitt mit einem auffällig hohen Guanosin-Gehalt (79%) befand (Abb. 46), der gegebenenfalls eine Bindung von CHLAMY 1 begünstigen konnte. Durch die *EcoR*1-Schnittstelle, die während der Mutation eingeführt worden war, war es jedoch möglich, in einem Doppelverdau mit *Dde*1 diesen 31 Bp-langen Bereich zu deletieren (Abb. 46).

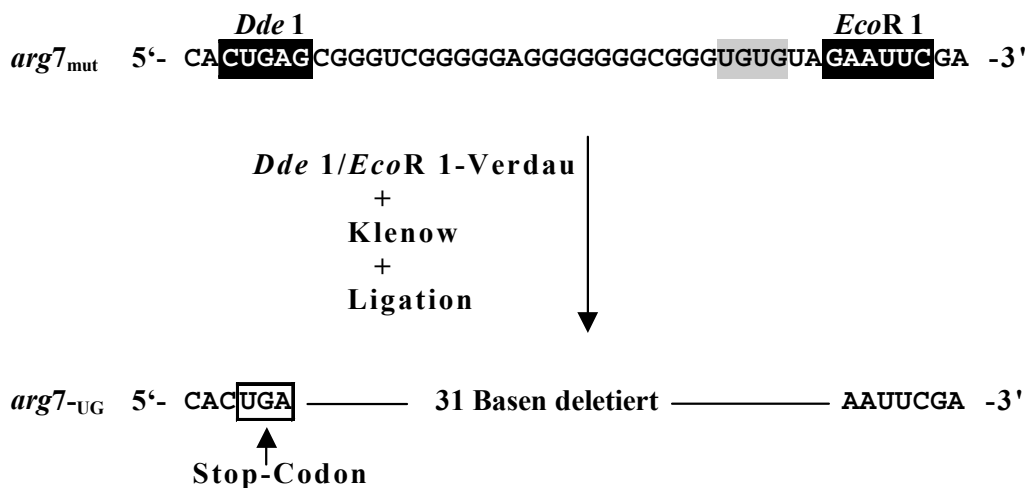


Abb. 46: Deletion eines 31 Bp-Fragments 5' des mutierten Bereichs von *arg7*

Ausgehend vom Plasmid pHW31 wurden durch einen *Dde*1/*EcoR*1-Verdau 31 Basen 5' der mutierten Sequenz deletiert. Um das in der *Dde*1-Schnittstelle gelegene Stop-Codon wiederherzustellen und die überhängenden Enden wieder ligieren zu können, wurden die Enden mit dem Klenow-Enzym geglättet und anschließend ligiert. „UG“-Elemente sind grau unterlegt, Schnittstellen sind invers dargestellt.

Da pHW33 durch den Doppelverdau in zahlreiche Fragmente zerfallen würde, mußte auch für die Deletion eine Strategie zur Subklonierung ausgearbeitet werden (Abb. 47). Ausgehend von pHW31 konnten durch drei separate Verdauungen drei Fragmente gewonnen werden, die nach Religation das linearisierte Plasmids mit der beabsichtigten Deletion ergaben. Nach dem Glätten der Enden mit dem Klenow-Enzym (s. 2.2.12.2) konnte durch Ligation (s. 2.2.12.5) das Plasmid wieder zirkularisiert werden.

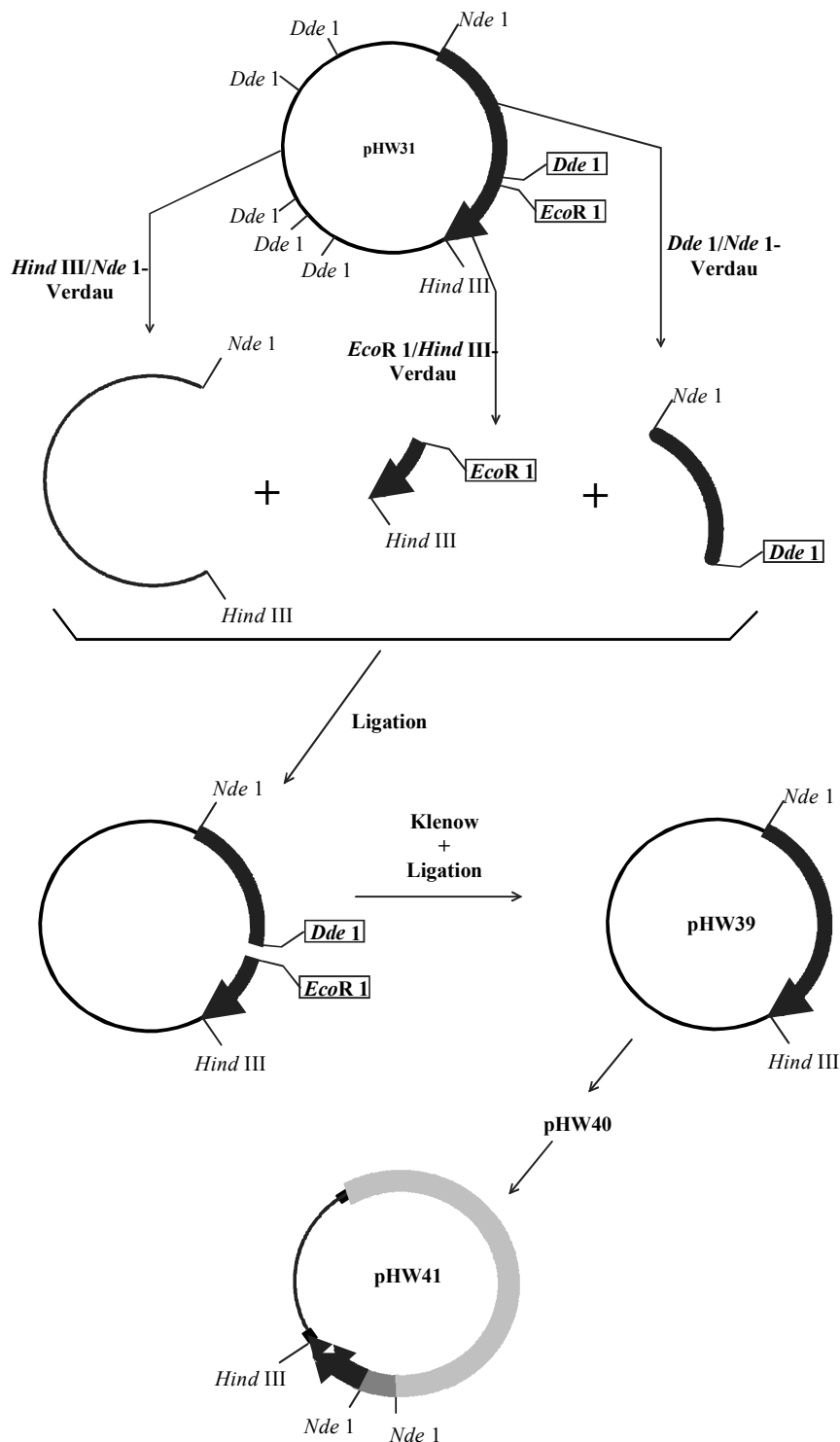


Abb. 47: Deletion eines *EcoRI*/*DdeI* Fragments aus dem 3'-UTR des *arg7_{mut}* Gens

Ausgehend von Plasmid pHW31, das den mutierten *arg7* 3'-UTR enthält, konnten durch drei unterschiedliche Doppelverdau drei Fragmente gewonnen werden, die nach Religation ein lineares Plasmid ergaben, dem das 31 Bp-lange *EcoRI*/*DdeI* Fragment fehlte. Nach Glätten der Enden mit dem Klenow-Enzym konnte das Plasmid durch Ligation wieder zirkularisiert werden (pHW39). In den zwei nachfolgenden Klonierungsschritten wurde dann, analog zu pHW33, das Plasmid pHW41 generiert, das das *arg7*-Gen mit der vorab eingeführten Mutation und der neu erzeugten 31 Bp-Deletion enthielt.

Mit zwei weiteren Klonierungsschritten, analog zur Umklonierung von pHW31 zu pHW33 (Abb. 43) entstand dann das Plasmid pHW41 (Abb. 47 u. Abb. 48) mit dem durch Mutation und Deletion modifizierten *arg7* 3'-UTR (=arg7_(-UG)).

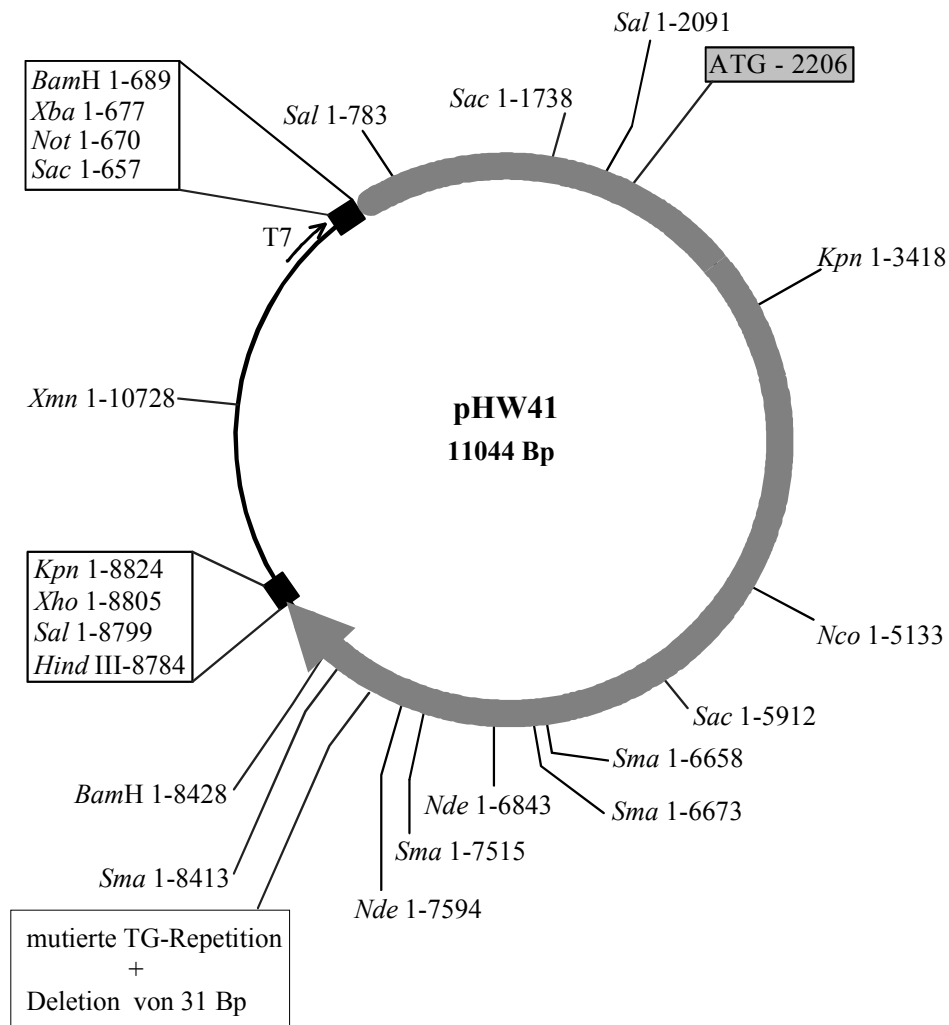


Abb. 48: Restriktionskarte des Plasmids pHW41

Ausgehend vom Plasmid pJD67 wurde durch eine *in vitro*-Mutagenese zunächst die „UG“-Repetition eliminiert. Anschließend wurden dann 31 Bp 5' der mutierten Sequenz deletiert.

Zur Kontrolle, daß die Bindung von CHLAMY 1 an den so mutierten 3'-UTR nicht mehr möglich war, wurde der 3'-UTR wieder über PCR amplifiziert und in pBluescript KS+ ligiert. Ein ³²P-markiertes Transkript wurde synthetisiert und im

„mobility shift“- und „UV-crosslink“-Experiment mit einem Proteinrohextrakt aus *C. reinhardtii* getestet (Abb. 49). Beide Experimente zeigten, daß die Bindung von CHLAMY 1 an den so mutierten *arg7* 3'-UTR (*arg7*_(-UG)) nicht mehr möglich war.

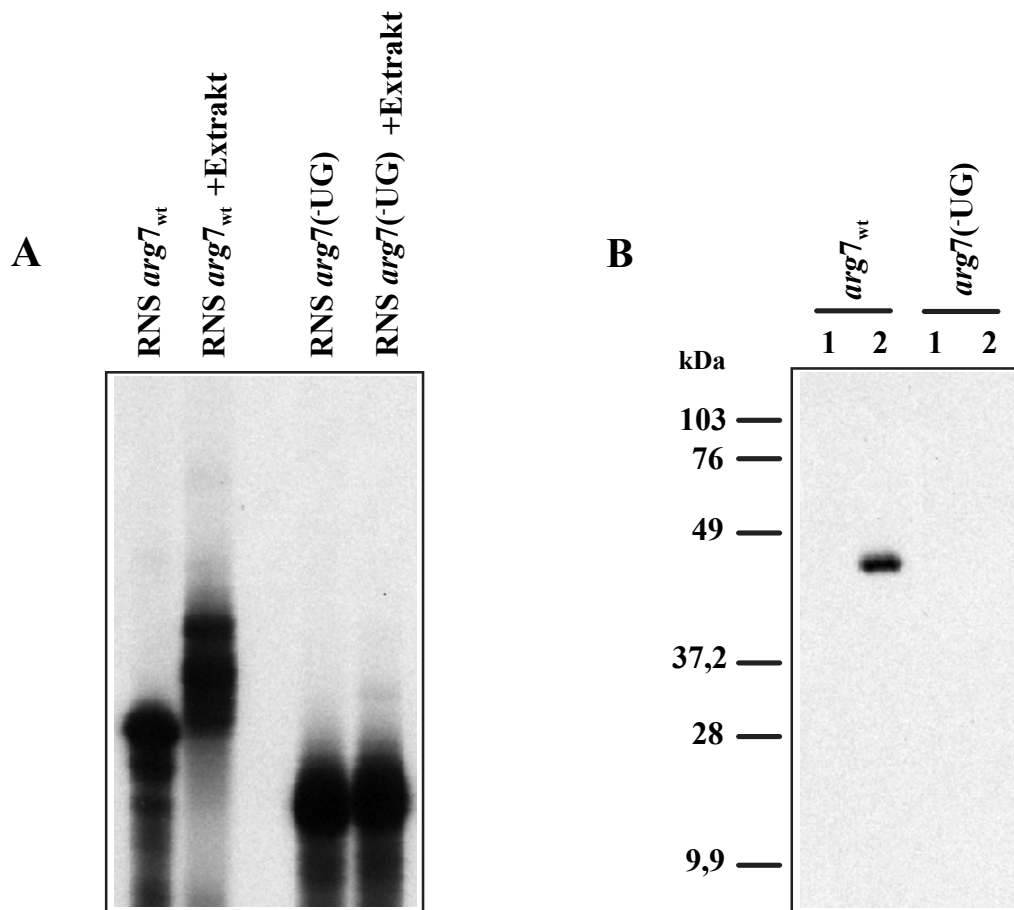


Abb. 49: „mobility shift“- und „UV-crosslink“- mit dem *arg7*(UG) 3'-UTR

(A) Mit dem Oligonukleotid-Paar OMM51/ OMM64 und pHW39 als Matrize wurde der *arg7*(UG) 3'-UTR amplifiziert (vergleiche auch Amplifikation des *arg7*_{wt} 3'-UTR). Nach Klonierung des Fragments in pBluescript KS+ wurde vom T7-Promotor ein ³²P-markiertes Transkript synthetisiert und zusammen mit dem Wildtyp-Transkript im „mobility shift“-Experiment mit einem Proteinrohextrakt aus *C. reinhardtii* getestet. (B) „UV-crosslink“-Experiment mit den beiden Transkripten. Spur 1 zeigt jeweils den Ansatz ohne UV-Bestrahlung, Spur 2 den Ansatz mit UV-Bestrahlung.

3.9.3 Transformation von *arg7*_{-UG} in ASL defiziente *C. reinhardtii*

Zur Transformation von *C. reinhardtii* kann sowohl zirkuläre als auch linearisierte Plasmid-DNS eingesetzt werden. Während in unserem Labor Transformationsexperimente mit zirkulärer Plasmid-DNS bessere Ergebnisse lieferten (Schneid, persönliche Mitteilung), berichtet Kindle (1990) von etwas höheren Transformationsraten mit linearisierter Plasmid-DNS. Für die Transformation mit pJD67 (*arg7*_{wt}) und pHW41 (*arg7*_{-UG}) wurden die Plasmide sowohl in ihrer superhelikalen als auch in linearisierter Form (mit *Xmn*I verdaut) eingesetzt.

Die Transformationsexperimente in den ASL-defizienten Stamm CLS 31-10 wurden freundlicherweise von Herrn Jens Grosch durchgeführt. Dazu wurde zunächst durch Paarung der *C. reinhardtii*-Stämme CLS 31-8 (*mt*⁻) und CLS 31-10 (*mt*⁺) Autolysin gewonnen (s. 2.2.8.1). Dieses wurde dann dazu benutzt die Zellwände von CLS 31-10 Zellen zu lysieren um daraufhin durch Agitation mit Glaskugeln die jeweilige DNS einzuführen (s. 2.2.8.2). Ein Ausplattieren auf Arginin-freies Medium erlaubte dann die Selektion der Transformanden. Erste Kolonien zeigten sich nach ca. einer Woche, jedoch wuchsen auch noch nach mehreren Wochen neue Kolonien heran. Für die weitere Analyse wurden nur die schnellwachsenden Kolonien verwendet. Bei den übrigen Klonen konnte davon ausgegangen werden, daß das Gen entweder unvollständig integriert worden war oder daß es an einer Position ins Genom integriert worden war, wo es zu einer irreversiblen Schädigung geführt hatte. Darüber hinaus zeigte sich auch, daß die Transformationsraten mit linearer Plasmid-DNS höher lagen als mit zirkulärer Plasmid-DNS.

Da die, in die Zellen eingeführte, DNS durch heterologe Rekombination ins Genom integriert wird, konnte es vorkommen, daß mehrere Kopien eines Gens aufgenommen werden. Ferner konnten durch eine unvollständige Integration wichtige regulatorische Elemente aus dem 3'-UTR und 5'-UTR fehlen. Diese Ereignisse konnten dann die Effekte der „UG“-Repetition als regulatorisches Element im 3'-UTR überdecken bzw. vollständig ausschalten. Aus diesem Grund

war eine Analyse auf die Anzahl und Vollständigkeit der integrierten *arg7_{wt}* bzw. *arg7_{UG}*-Gene durch eine „Southern“-Charakterisierung unumgänglich.

Um zunächst eine Vorauswahl der solchermaßen zu analysierenden Klone zu treffen, wurden Zellen der Transformanden in einem LD-Zyklus kultiviert und zu Beginn des Tages (LD2) und zu Beginn der Nacht (LD14) geerntet. In einem Enzymtest konnte dann die Aktivität der ASL bestimmt werden (Abb. 50).

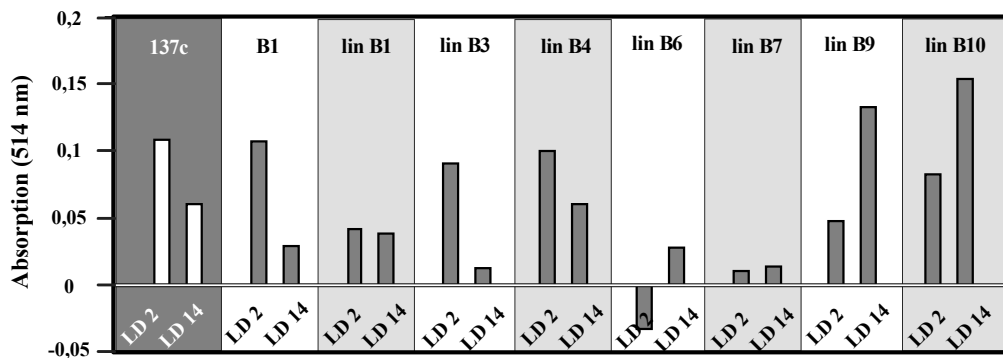


Abb. 50: ASL-Aktivität der mit pJD67 (*arg7*) transformierten Zellen

Zellen, die mit dem Plasmid pJD67 (*arg7*) transformiert worden waren, wurden zu LD2 und LD14 geerntet und auf ihre Argininosuccinat-Lyase-Aktivität untersucht. Zum Vergleich ist zuvorderst die ASL-Aktivität des Wildtyps 137c aufgezeigt. Die Bezeichnung „lin“ markiert Transformanden, die durch ein linearisiertes Plasmid transformiert wurden.

Bei den Zellen, die mit dem wt-Konstrukt (pJD67) transformiert worden waren, war ein ähnliches Aktivitätsmuster wie beim Wildtyp-Stamm 137c zu erwarten. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen (Abb. 50) zeigten jedoch, daß nur drei (B1, lin B3, lin B4) der acht analysierten Transformanden eine dem Wildtyp vergleichbare Tag/Nachtregulation aufwiesen. Bei den übrigen Transformanden war eine nur sehr geringe (lin B1, lin B6, lin B7) bzw. sogar gegenläufige Aktivität (lin B9, lin B10) zu verzeichnen. Ursache hierfür konnte eine unvollständige Integration und/oder Integration hinter einem starken, anders regulierten Promotor sein. Für die detaillierte Charakterisierung boten sich daher die Klone „B1“, „lin B3“ und „lin B4“ an.

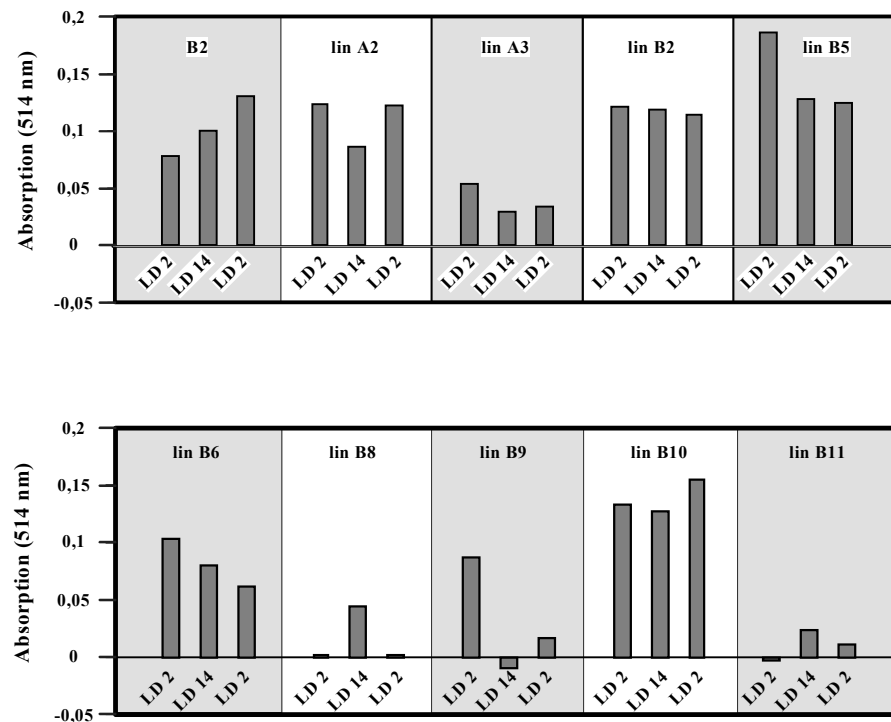


Abb. 51: ASL-Aktivität der mit pHW41 (*arg7*_{-UG}) transformierten Zellen

Zellen, die mit dem Plasmid pHW41 (*arg7*_{-UG}) transformiert worden waren, wurden zu LD2, LD14 und nochmals zu LD2 geerntet und auf ihre Argininosuccinat-Lyase-Aktivität untersucht. Die Bezeichnung „lin“ markiert Transformanten, die durch ein linearisiertes Plasmid transformiert wurden.

Analog wurden die Klone aus der Transformation mit dem Plasmid pHW41 (*arg7*_{-UG}) in einem LD-Zyklus kultiviert, zu drei Zeitpunkten geerntet und auf ihre ASL-Aktivität getestet. Durch die Eliminierung der CHLAMY 1-Bindestelle war dabei eine Aufhebung der Tag/Nachtregulation zu erwarten. Wie Abb. 51 zeigt, fand sich bei nahezu allen Kulturen weder zu LD2 ein Aktivitätsmaximum noch zu LD14 ein Aktivitätsminimum. Einige Klone zeigten eine nahezu konstante Aktivität (lin B2, lin B10), andere wiederum eine kontinuierlich zunehmende (B2) bzw. abnehmende Aktivität (lin B5, lin B6). Alle diese Klone boten sich an für die nähere Charakterisierung durch die „Southern“-Hybridisierung.

Die genomischen Charakterisierung sollte dann darüber Aufschluß geben, ob der Transformant das jeweilige Gen auch mit dem vollständigen 3'-UTR und 5'-UTR integriert hatte, da nur so der regulatorische Einfluß der „UG“-Repetition isoliert untersucht werden konnte. Ferner war es nötig sicherzustellen, daß keine

Mehrfachintegration erfolgt war, da dies zu Überlagerungseffekten führen konnte. Transformanden, die diese Kriterien erfüllten, konnten dann detailliert auf den Einfluß der „UG“-Repetition auf die circadiane Regulation der ASL untersucht werden. Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Zulassungsarbeit von Frau Susanne Zollner fortgesetzt.

4 Diskussion

Die Bindestellen für die circadian kontrollierten RNS-Bindeproteine CCTR aus *G. polyedra* und CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* konnten durch *in vitro*-Mutageneseexperimente näher charakterisiert werden. Für eine hohe Bindeaffinität beider Proteine sind sechs bis sieben „UG“-Elemente in Folge nötig. Dieses Ergebnis trug zur Identifikation von acht mRNS in *C. reinhardtii* bei, an die CHLAMY 1 spezifisch binden kann. Durch Kompetitionsexperimente konnte die Affinität von CHLAMY 1 zu den 3'-UTRs der verschiedenen mRNS-Molekülen bestimmt werden. Die Argininosuccinat-Lyase, Translationsprodukt einer der mRNS, wurde ausgewählt, um Umfang und Charakter der circadianen Regulation zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des Enzyms circadian reguliert ist; ob dies auch durch eine Regulation der Transkription bedingt ist, bleibt jedoch noch zu klären. Durch eine gezielte Mutation wurde das Bindemotiv für CHLAMY 1 in der *arg7*-mRNS deletiert. Nach der Transformation in einen *arg7* Stamm sollte eine Analyse der Transformanden Aufschluß über die Bedeutung des Bindemotivs für die circadiane Regulation der ASL *in vivo* geben. Eine erste Analyse der transformierten Zellen zeigte, daß bei einigen die circadiane Regulation ausgefallen war, während sie bei anderen mit zum Teil unterschiedlichen Phasen noch fortbestand.

4.1 Charakterisierung des RNS-Bindemotivs für CHLAMY 1 und den CCTR durch *in vitro*-Mutagenese

Durch gezielte Mutationen in dem 22 Nukleotide langen RNS-Bindemotiv aus dem *lbp* 3'-UTR galt es die Bedeutung einzelner Elemente dieser Sequenz für die Bindung von CHLAMY 1 und dem CCTR zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden zum einen die die [U(U)G]₇-Wiederholung flankierenden Bereiche und zum anderen die einzelnen „U(U)G“-Elemente selbst mutiert. Das Ziel war, die

Folge von sieben „U(U)G“-Elementen zu unterbrechen und nicht zwangsläufig beide Basen eines Elements auszutauschen. Die Bestimmung der Bindeaktivität von CHLAMY 1 und dem CCTR zu den mutagenisierten Transkripten zeigte, daß die [U(U)G]₇-Wiederholung das Bindemotiv für beide Proteine darstellt. Für eine geringe Bindeaktivität sind vom 5'-Ende der Repetition aus mindestens fünf (CCTR 12 % und CHLAMY 16 % Bindeaktivität) bzw. vom 3'-Ende mindestens sechs (CCTR 67 % und CHLAMY 1 35 % Bindeaktivität) „U(U)G“-Elemente in Folge nötig. Volle Bindeaktivität wird dagegen nur mit allen sieben „U(U)G“-Elementen und den flankierenden Bereichen erreicht. In Hinblick auf die Bindeaffinität zu den mutierten Transkripten zeigen CHLAMY 1 und der CCTR eine deutliche Korrelation, da der Austausch von „UG“-Elementen bei beiden zu einer vergleichbaren Reduktion der Bindung führt. Dies deutet auf eine hohe funktionelle Homologie ihrer RNS-Bindedomänen hin.

Für eine reduzierte Bindung können zwei Effekte in Betracht gezogen werden. Zum einen können die ausgetauschten Nukleotide Teil der zentralen Bindestelle sein, somit ist die Primärstruktur der RNS entscheidend für die Bindung. Zum anderen können sie aber auch zum Erhalt der Sekundärstruktur der RNS beitragen, was bedeuten würde, daß ein Austausch zu einer Destabilisierung der optimalen Struktur führt. Die Computeranalyse der Sekundärstruktur des *lbp* 3'-Endes (Mittag *et al.*, 1994) hatte gezeigt, daß die 22 Nukleotide lange Region Teil einer Haarnadel/Schleifenstruktur ist (Abb. 52). Die „U(U)G“-Elemente befinden sich dabei hauptsächlich im Bereich der einzelsträngigen Schleifenregion. Die Transkripte pHW9, 10 und 11 (Austausch von 1-3 „UG“-Elementen am 5'-Ende der Repetition) wiesen nach diesem theoretischen Modell nur Veränderungen in der Primärstruktur der Schleifenregion auf. Dagegen zeigten die Transkripte pHW2 (Austausch der zentralen fünf „U(U)G“), pHW7, pHW8 und pHW6 (Austausch von 1-3 „UG“-Elementen am 3'-Ende der Repetition) sowie pHW3 und pHW5 (Austausch der flankierenden Sequenzen) auch Veränderungen in der Sekundärstruktur, die durch die Eliminierung stabilisierender Basenpaarungen hervorgerufen würden. Die Abhängigkeit der Bindeaktivität eines RNS-Bindeproteins von Sequenz und Sekundärstruktur der RNS wurde für die Interaktion des IRE-BP („iron-responsive element binding protein“) mit der

humanen Ferritin-RNS bereits gezeigt (Jaffrey *et al.*, 1993). Das IRE besteht ebenfalls aus einer Haarnadel/Schleifenstruktur. In der Schleifenregion sind die Schleifengröße und die Basenzusammensetzung kritisch für die Bindung des IRE-BP. Im Gegensatz dazu ist in der oberen Haarnadelregion die Basenzusammensetzung irrelevant, während die Anzahl der gepaarten Basen extrem wichtig für eine Bindung des IRE-BP ist. Vergleichbare Mechanismen könnten auch für die Interaktion von CHLAMY 1 bzw. dem CCTR mit der *lbp*-mRNS zutreffen.

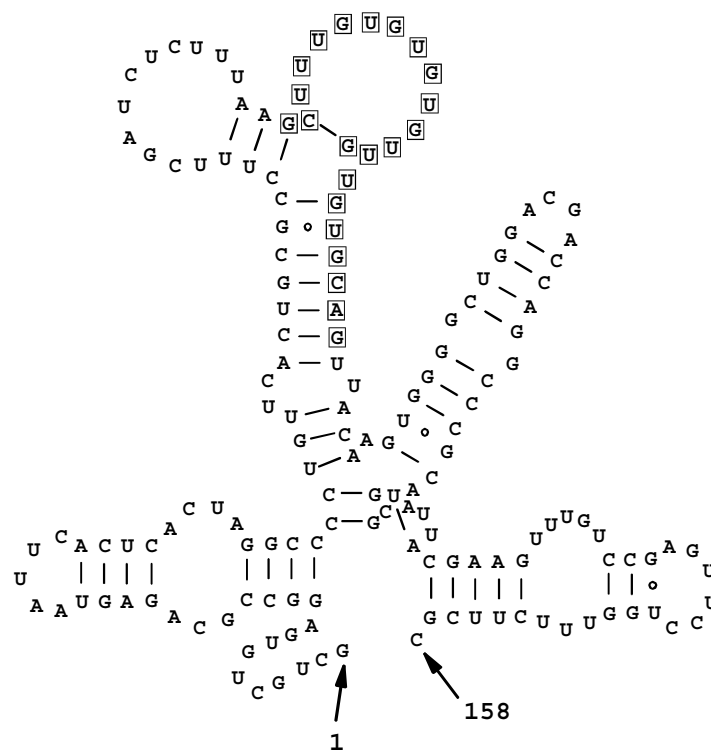


Abb. 52: Theoretische Sekundärstruktur des *lbp* 3'-UTR (aus Mittag *et al.*, 1994)

Die Faltung der RNS des gesamten *lbp* 3'-UTR wurde mithilfe eines Computerprogramms nach Abrahams *et al.* (1990) vorhergesagt. Die 22 durch Kästchen umrandeten Nukleotide in der Mitte des 3'-UTR stellen die Bindestelle für den CCTR dar.

4.2 Sichtung einer cDNS-Bank und von „GenBank“ (NCBI) nach *C. reinhardtii*-Genen mit der „UG“-Repetition

Die nähere Charakterisierung des Bindemotivs für CHLAMY 1 hatte gezeigt, daß auch in *C. reinhardtii* eine (UG)₇-Wiederholung das zentrale Bindemotiv darstellt. Dies implizierte, daß es somit auch ein oder sogar mehrere Ziel-mRNS in *C. reinhardtii* geben konnte. Zur ihrer Detektion wurde zunächst eine cDNS-Bank aus *C. reinhardtii* synthetisiert und mit einer Sonde, die gegen die „U(U)G“-Wiederholung gerichtet ist, gesichtet.

Zur Synthese der cDNS-Bank wurde poly(A⁺)RNS aus Zellen, die gegen Ende des Tages (LD10) geerntet worden waren, verwendet, da die Bindung von CHLAMY 1 an seine Ziel-RNS zu diesem Zeitpunkt maximal ist. Die Qualität der cDNS-Bank wurde durch verschiedene Kontrollen während der Synthese und nach der Fertigstellung überprüft. Die Größe der transkribierten und in den Vektor ligierten cDNS-Fragmente lag zwischen 0,5 und 5,0 kB, was dem Größenbereich von cDNS-Molekülen, die von eukaryotischer mRNS revers transkribiert werden, entspricht (Sambrook & Russell, 2001). Der Titer der Bank lag mit ~ 900.000 pfu so hoch, daß auch Kopien schwach exprimierter mRNS vertreten sein sollten. Die cDNS-Bank sollte somit eine repräsentative Kopie der poly(A⁺)RNS-Fraktion darstellen.

564.000 pfu wurden auf Membranen übertragen und bei 37°C mit der Sonde (OMM40), die komplementär zur „UG“-Repetition des *lbp*-Gens ist, hybridisiert. Nachfolgend wurden die Membranen bei Temperaturen bis zu 42°C gewaschen (s. 2.2.7.8). Mit dieser Methode waren zunächst nur cDNS zu identifizieren, deren mRNS eine [T(T)G]₇-Repetition im 5'-UTR, 3'-UTR und/oder dem offenen Leseraster (ORF) enthalten. Obwohl die Hybridisierungsbedingungen so gewählt worden waren, daß [T(T)G]₇-Repetitionen zuverlässig mit der Sonde OMM40 hybridisieren sollten, konnte nur ein positiv reagierender Klon identifiziert werden. Wie die Sequenzierung der daraus isolierten cDNS zeigte, handelte es sich dabei um die der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH). Die mRNS der GAP-DH enthält jedoch weder in den UTRs noch im ORF eine „UG“-Repetition. Die größte Homologie (65 %) zwischen ihrer cDNS und der

Sonde OMM40 [5'-(AGCT)CACACAACACACACA(AGCT)-3'] fand sich im kodierenden Bereich des Gens. Das Ergebnis zeigte, daß die gewählte Hybridisierungstemperatur von 37°C bzw. auch die Temperatur der nachfolgenden Waschschrte zu niedrig war, um ausschließlich die spezifische Hybridisierung von cDNS mit einer [T(T)G]₇-Repetition zu ermöglichen. Da mittlerweile bekannt ist, daß es in *C. reinhardtii* zahlreiche mRNS mit „UG“-Repetition gibt, stellt sich die Frage, warum keine einzige der entsprechenden cDNS isoliert werden konnte. Ein Erklärungsmodell hierfür bezieht sich auf die Sekundärstruktur, die 3'-UTRs mit einer „UG“-Repetition vermutlich ausbilden können (gezeigt für den *lbp* 3'-UTR; Abb. 52). Demnach könnte, trotz vorangegangener Denaturierung, die stabile Haarnadel/Schleifenstruktur bei den gewählten Hybridisierungsbedingungen (37°C) gegebenenfalls wieder renaturieren, womit ein Hybridisieren der Sonde ausgeschlossen wäre.

Eine Steigerung der Spezifität sollte die auf PCR basierende Sichtung der cDNS-Bank gewährleisten. Durch den Einsatz eines zweiten Oligonukleotids, das komplementär zum poly(A⁺)-Schwanz der mRNS war, und entsprechend angepaßter Amplifikationsbedingungen sollte eine spezifische Vervielfältigung von 3'-Enden mit „UG“-Repetition erzielt werden. Die Anlagerung der Oligonukleotide in der PCR erfolgte aufgrund vorangegangener Experimente mit dem *lbp* 3'-Ende aus *G. polyedra* (Mittag, persönliche Mitteilung) bei 37°C. Das Ergebnis der Amplifikation zeigte jedoch, daß die Stringenz offenbar noch zu gering war, da 3'-Enden mit nur 3-4 „U(U)G“-Elementen in Folge vervielfältigt worden waren. Zur Steigerung der Spezifität wurde daraufhin zum einen die Hybridisierungstemperatur auf 42°C erhöht und zum anderen eine Heißstart-Polymerase eingesetzt, die eine Vervielfältigung nur noch bei ganz spezifischer Hybridisierung beider Oligonukleotide ermöglichen sollte. Sowohl bei einer Anlagerungstemperatur von 42°C als auch 37°C ließ sich keine Amplifikation mit der Heißstart-Polymerase erzielen. Die Ergebnisse dieser unterschiedlichen PCR-Experimente scheinen vor allem eine Hypothese zu unterstützen: eine Anlagerung der Oligonukleotide an 3'-UTRs mit „UG“-Repetition ist aufgrund der Ausbildung einer starken Sekundärstruktur nicht möglich. Die Tatsache, daß sich unter denselben Bedingungen das *lbp* 3'-Ende mit dem Plasmid MM3 als Matrize

amplifizieren ließ, ist auf die hohe Konzentration der Matrizemoleküle (10 nMol) in diesem PCR-Ansatz zurückzuführen. Ferner sollte nicht außer acht gelassen werden, daß die Amplifikationsbedingungen gezielt auf die Vervielfältigung kurzer DNS-Sequenzen (<500 Bp) optimiert worden waren. Wie sich später zeigte, war bei einigen der „UG“-haltigen mRNS aus *C. reinhardtii* jedoch der Abstand zwischen der „UG“-Repetition und dem poly(A⁺)-Schwanz größer als 500 Bp (zB.: *arg7*, *nii1*, *lip-36G1*). Diese 3'-Enden konnten unter den gegebenen Bedingungen also nicht amplifiziert werden.

Eine Sichtung von „GenBank“ (NCBI) nach allen bis dato (Juli 1999) sequenzierten Genen aus *C. reinhardtii* führte nicht zur Identifikation von mRNS mit dem [U(U)G]₇-Motiv im 3'-UTR. Die Suche mit einem einfachen (UG)₇-Motiv ermöglichte dagegen die Detektion von acht mRNS mit zwischen sieben und sechzehn „UG“-Wiederholungen im 3'-UTR. Der Großteil dieser mRNS ist im Zellkern kodiert. Sie werden im Zytosol translatiert, aber ihre Produkte werden dann in den Chloroplasten transportiert, wo sie aktiv sind. Sie kodieren für Proteine, die Komponenten eng zueinander in Beziehung stehender Stoffwechselwege sind. Einige von ihnen nehmen Schlüsselpositionen im Stickstoff-Stoffwechsel ein: dazu zählen NRT2;3, NII1, GS2 und ASL. Die übrigen kodieren hauptsächlich für Proteine, die mit der Photosynthese in Verbindung stehen (RUBISCO, POR, LIP). Lediglich YPTC4, ein G-Protein dessen Funktion noch nicht völlig geklärt ist, läßt sich in keine dieser beiden Gruppen einordnen.

Hervorzuheben ist, daß die *rbcS1*-mRNS in ihrer „UG“-Repetition auch zwei „UUG“-Elemente enthält, die sich jedoch an Position acht und neun der (UG)₉-Wiederholung befinden. Das „UUG“-Element kann also vermutlich Teil des Bindemotivs in *C. reinhardtii* sein, muß sich aber nicht, wie im *lbp* 3'-UTR, an Position fünf der Repetition befinden.

4.3 Interaktion zwischen CHLAMY 1 und den mRNS mit „UG“-Repetition im 3'-UTR

Im „mobility shift“-Experiment (Abb. 11) konnte gezeigt werden, daß die 3'-Enden der *gs2*, *arg7*, *rbcS1*, *nii1*, *nrt2;3*, *lip-36G1*, *yptc4* und der *lpcr-1*-mRNS durch Proteine mit ähnlicher elektrophoretischer Mobilität wie CHLAMY 1 retardiert wurden. Diese Proteine binden spezifisch an die „UG“-Wiederholung, da sie durch ein Transkript, dem die „UG“-Wiederholung fehlt [*lbp*(-UG)], nicht kompetitiert werden konnten. Dies erlaubt den Schluß, daß es sich bei diesen Proteinen um CHLAMY 1 bzw. um CHLAMY 1-ähnliche Proteine handelt. Lediglich bei *yptC4* waren zusätzlich auch RNS/Proteinkomplexe zu beobachten, die sich nicht durch *lbp*(-UG) kompetitieren ließen; offenbar konnten mit dem *yptC4* 3'-Ende also auch andere Proteine als CHLAMY 1 interagieren. Diese Proteine zeigten im „mobility shift“-Experiment ein ähnliches Laufverhalten wie CHLAMY 2 und 3, die an den *lbp* 3'-UTR binden. Fragen nach ihren Bindemotiven und nach einer circadianen Kontrolle ihrer Bindeaktivität bleiben jedoch noch zu beantworten.

Bei mehreren Transkripten waren zwei oder mehrere RNS/Proteinkomplexe mit ähnlicher Mobilität zu erkennen, die nicht durch *lbp*(-UG) kompetitiert werden konnten. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist die Existenz eines weiteren „UG“-bindenden Proteins in *C. reinhardtii*. Dieses Protein sollte dann aber mit allen Transkripten interagieren, was nicht der Fall ist. Auch die „UV-crosslinking“-Experimente widerlegen dieses Modell. Alle acht Transkripte werden jeweils nur von einem einzigen Protein gebunden und können durch UV-Strahlung vernetzt werden. Dieses hat unter denaturierenden Bedingungen die gleiche Masse (43-45 kDa) wie CHLAMY 1, und bindet, wie für das *gs2*-Transkript gezeigt, auch an die „UG“-Wiederholung. Eine naheliegende Erklärung ist somit die Bindung mehrerer CHLAMY 1-Moleküle an diese Transkripte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß die zusätzlichen RNS/Proteinkomplexe insbesondere bei den Transkripten mit langen „UG“-Wiederholungen bzw. flankierenden „UG“-Wiederholungen auftraten. Eine Hybridisierung von Abschnitten dieser langen „UG“-Wiederholungen mit

komplementären Oligonukleotiden könnte, gefolgt von Untersuchungen zur Bindung von CHLAMY 1, zur Klärung dieser Frage beitragen. Ebenso würde die computergestützte Berechnung der Sekundärstruktur dieser Transkripte sicher Hinweise darauf geben können, ob die gesamte „UG“-Wiederholung einzelsträngig vorliegt und somit auch von mehreren CHLAMY 1-Molekülen gebunden werden könnte.

Die Bindung von CHLAMY 1 und dem CCTR an den *lbp* 3'-UTR scheint sowohl von der Sequenz als auch von der Sekundärstruktur abhängig zu sein (Mittag *et al.*, 1994; Mittag, 1996). Es stellte sich daher die Frage, welchen Einfluß die sehr unterschiedliche Länge und Struktur der „UG“-Wiederholungen in den acht mRNS auf die Bindeaktivität von CHLAMY 1 hat. Die hierzu durchgeführten Konkurrenzexperimente zeigten, daß sich die Bindeaktivität von CHLAMY 1 zu den verschiedenen Transkripten stark unterscheidet: während sich eine auf 50 % reduzierte Bindung von CHLAMY 1 bei dem stärksten Kompetitor schon mit der einfachen Menge (bezogen auf die Zahl der *gs2*-Transkript-Moleküle) erzielen läßt, ist beim schwächsten Kompetitor ein 36facher Überschuß nötig. Eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der „UG“-Elemente und der Bindestärke war nicht zu erkennen. Am augenfälligsten wird dies bei einem Vergleich zwischen dem stärksten Kompetitor *gs2* (7+1 „UG“), der bei einfachem Überschuß die Bindung um 50 % reduziert, dem Kompetitor *nii1* (9 „UG“), bei dem ein dreifacher Überschuß die gleiche Wirkung erzielt, und *nrt2;3* (16 „UG“), bei dem ein achtfacher Überschuß nötig ist. Andererseits ist *nrt2;3* jedoch ein deutlich besserer Kompetitor als *lpcr-1* (7 „UG“), der erst bei 36fachem Überschuß die CHLAMY 1-Bindung um 50 % reduziert. Die Daten zeigen, daß mit 7-8 „UG“-Elementen in Folge sowohl die höchste als auch eine sehr niedrige Bindeaktivität von CHLAMY 1 erzielt werden kann. Bei zusätzlichen „UG“-Elementen kann sowohl eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung der Bindung zu beobachten sein. Die Interpretation dieser Daten legt folgenden Schluß nahe: solange mindestens 7 „UG“-Elemente in Folge vorhanden sind, bewirken weitere „UG“ nicht zwangsläufig eine Verbesserung der CHLAMY 1-Bindung. Vielmehr könnte den die „UG“-Repetition flankierenden Sequenzen eine wichtige Aufgabe bei der Ausbildung einer einzelsträngigen Schleifenregion, an die CHLAMY 1

binden kann, zukommen. CHLAMY 1 würde demnach nur bei optimaler Anzahl der „UG“-Elemente und den perfekten flankierenden Sequenzen die maximale Affinität zum Bindemotiv im 3'-UTR entwickeln.

4.4 CHLAMY 1: ein wichtiger circadianer Regulator im Stoffwechsel von *C. reinhardtii* ?

Es wurden acht Ziel-mRNS gefunden, an die CHLAMY 1 bindet und die damit potentielle Ziele circadianer Regulation darstellen. Die meisten von ihnen kodieren für Proteine, die in eng zueinander in Beziehung stehenden Stoffwechselwegen involviert sind (Abb. 53).

Einige von ihnen nehmen Schlüsselpositionen im Stickstoffwechsel ein. Dazu zählt die Aufnahme von Nitrit durch den Nitrit/Nitrat-Transporter NRT2;3 (Quesada *et al.*, 1998a), die Reduktion zu Ammonium durch die Nitritreduktase NII1 (Quesada *et al.*, 1998b), die Fixierung des Ammoniums in Form von Glutamin durch die plastidäre Glutamin-Synthetase GS2 (Chen und Silflow, 1996) und schließlich die Synthese von Arginin durch die ASL (Auchincloss *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß der Stickstoffwechsel in *C. reinhardtii* offenbar zum Teil circadian reguliert ist. So wurde gezeigt, daß die Ammonium-Aufnahme unter dem Einfluß der inneren Uhr steht, mit einem Maximum zu Beginn der Tagphase (Byrne *et al.*, 1992). Auch die Nitrit-Aufnahme ist zumindest diurnal, gegebenenfalls sogar circadian reguliert, ebenfalls mit einem Maximum in der frühen Tagphase (Pajuelo *et al.*, 1995). Damit einher geht eine Zunahme der Nitritreduktase-Aktivität (in der ersten Hälfte der Tagphase), die offenbar auf eine gesteigerte *de novo*-Synthese zurückzuführen ist.

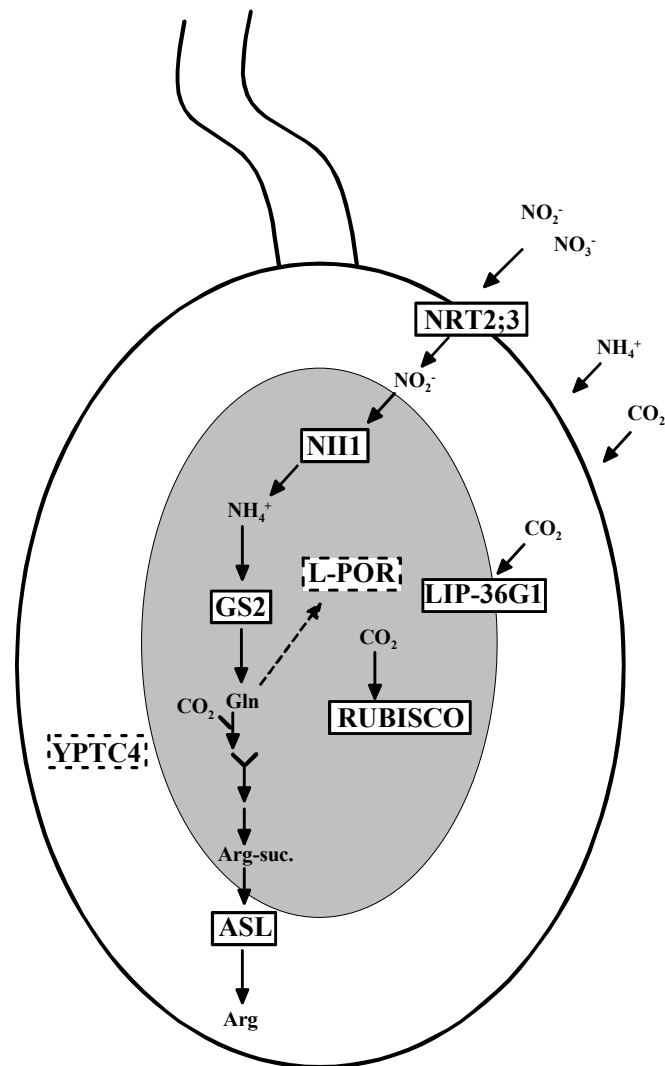


Abb. 53: Lokalisierung der Proteine, für die die „UG“-haltigen mRNS aus *C. reinhardtii* kodieren

Die Abbildung zeigt schematisch eine *C. reinhardtii*-Zelle mit dem Chloroplasten, der einen Großteil des Zellvolumens einnimmt. Proteine, deren mRNS das Bindemotiv für CHLAMY 1 im 3'-UTR tragen, sind umrandet. Eine durchgehende Umrandung steht für eine hohe Affinität, eine unterbrochene Umrandung steht für eine geringe Affinität von CHLAMY 1 zu der jeweiligen mRNS. Abkürzungen: Arg, Arginin; Arg-suc., Argininosuccinat; Gln, Glutamin.

Die zweite Gruppe von Ziel-mRNS für CHLAMY 1 kodiert für Proteine, die in enger Beziehung zur Photosynthese stehen. Hierzu zählen die kleine Untereinheit (Gen: *rbcS1*) des CO₂-fixierenden Enzyms RUBISCO, der in der äußeren Chloroplastenmembran lokalisierte CO₂-Transporter LIP-36G1 und die lichtabhängige Form der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (L-POR). Bislang wurden noch keine Untersuchungen zur circadianen Regulation dieser Gene unternommen, jedoch scheint eine Regulation der Photosynthese durch die innere

Uhr durchaus sehr sinnvoll für die Zelle, da sie so die nötigen Enzyme schon mit dem Einsetzen des Tageslichts bereitstellen kann und das Sonnenlicht dadurch optimal nutzt.

Es fällt auf, daß NRT2;3, NII1, GS2, ASL, LIP-36G1, RBCS1 und L-POR im Zellkern kodiert und im Zytoplasma translatiert werden. Sie sind dann entweder im Chloroplasten aktiv bzw. durch ihre Funktion eng mit dem Stoffwechsel des Chloroplasten verbunden. Lediglich YPTC4 muß hiervon ausgenommen werden; es hat vermutlich keine Verbindung zum Stoffwechsel des Chloroplasten, sondern nimmt andere Funktionen wahr.

Eine spätere Suche in „GenBank“ (Februar 2002) erbrachte fünf weitere Gene mit 6 bis 33 „UG“-Elementen in Folge, die zum Teil von weiteren „UG“-Elementen flankiert sind (Tab. 10). Einige dieser mRNS enthalten sogar bis zu drei „UG“-Repetitionen in ihrem 3'-UTR. Der 5'-UTR und das offene Leseraster (ORF) dieser mRNS sind dagegen frei von „UG“-Wiederholungen. *Mt4* kodiert für ein Protein, das bei geringer CO₂-Konzentration exprimiert wird und das möglicherweise in Signaltransduktion involviert ist (Villand *et al.*, unveröffentlicht). Zwischen dem Stopcodon und dem Poly(A)-Signal seiner mRNS finden sich zwei „UG“-Repetitionen mit 6+4 bzw. 33+1 „UG“-Elementen. Aus der *ccm1*-prä-mRNS entstehen durch differentielles „splicing“ die *ccm1-A*- und die *ccm1-B*-mRNS. Beide kodieren für Proteine, die vermutlich als Transkriptionsfaktoren den kohlenstoffkonzentrierenden Mechanismus induzieren (Fukuzawa *et al.*, 2001). Sie tragen jeweils drei „UG“-Repetitionen mit 13+4, 19+5 und 7 „UG“-Elementen in ihrem 3'-UTR. Da die veröffentlichte mRNS-Sequenz kein Poly(A)-Signal enthält, ist der 3'-UTR offenbar noch nicht vollständig sequenziert – das Vorkommen weiterer „UG“-Repetitionen kann also nicht ausgeschlossen werden. Das Gen *maa2* kodiert für einen „trans-splicing“-Faktor für Chloroplasten Gruppe II Introns in der *psaA*-mRNS (Perron *et al.*, 1999). In seinem 3'-UTR findet sich eine „U(U)G“-Repetition mit 32 „UG“ und einem „UUG“ in Folge. *Maa2* und *rbcS1* sind damit die einzigen mRNS aus *C. reinhardtii*, bei denen auch das „UUG“-Element vorkommt. *Cyt c1* kodiert für das mitochondriale Cytochrom c1, einen Elektronentransporter in der Atmungskette (Atteia *et al.*, unveröffentlicht). Der 3'-UTR von *cyt c1* enthält eine

„UG“-Repetition mit 15+5 „UG“. *Oda11* kodiert für ein Flagellen-Dynein (Mitchell & Brown, 1999). In seinem 3'-UTR findet sich eine „UG“-Repetition mit 18 „UG“. Diese fünf mRNS tragen somit alle eine oder mehrere potentielle Bindestellen für CHLAMY 1.

Tab. 10: Neu identifizierte *C. reinhardtii*-mRNS mit einer „UG“-Repetition im 3'-UTR („GenBank“-Suche im Februar 2002)

Gen (GenBank Acc.)	Genprodukt	UG-Repetition (ab Position)
<i>ccm1-A</i> (AB052695) [bzw. <i>ccm1-B</i> (AB052696)]	Regulatorisches Gen, das die Induktion des kohlenstoffkonzentrierenden Mechanismus kontrolliert; vermutlich Transkriptionsfaktor (Fukuzawa, <i>et al.</i> , 2001)	2312 -(UG) ₃ UC (UG) ₁ G (UG) ₁₃ 2992 -(UG) ₁ CCA (UG) ₁₉ CA (UG) ₂ UAU (UG) ₁ CG (UG) ₁ 3726 -(UG) ₇
<i>mt4</i> (AF426154)	Genprodukt möglicherweise in Signaltransduktion involviert, wird bei geringer CO ₂ -Konzentration exprimiert (Villand <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	1244 -(UG) ₄ CG (UG) ₆ 1414 -(UG) ₃₃ GA (UG) ₁
<i>maa2</i> (AJ243394)	Faktor für das „Trans-splicing“ von Chloroplasten Gruppe II Introns (Perron <i>et al.</i> , 1999)	1493 -(UG) ₃₂ (UUG) ₁
<i>cytc1</i> (AF245393)	Cytochrom C1 (mitochondrial) (Atteia <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	1566 -(UG) ₂ CG (UG) ₂ CG (UG) ₁₅ UU (UG) ₁
<i>oda11</i> (L26049)	Flagellen Dynein (Mitchell & Brown, 1997)	17842 -(UG) ₁₈

Von besonderem Interesse sind *ccm1-A* und *ccm1-B*, die für potentielle Transkriptionsfaktoren kodieren. Zu den Genen, deren Expression sie regulieren, zählen u. a. die periplasmatische Carboanhydrase 1 (*cah1*), die plastidäre Carboanhydrase 3 (*cah3*) und die mitochondrialen Carboanhydrasen 1 und 2 (*mca1*, *mca2*), zwei photorespiratorische Enzyme: eine Glycolat-Dehydrogenase und eine Phosphoglycolat-Phosphatase (Gene sind noch nicht isoliert), die im Chloroplasten lokalisierte Form der Glutamin-Synthetase (*gs2*) und der plastidäre CO₂-Transporter LIP36 (Xiang *et al.*, 2001; Fukuzawa, *et al.*, 2001).

Erfolgt tatsächlich eine Bindung von CHLAMY 1 an diese mRNS, gefolgt von einer Regulation der Translation, so bedeutet dies, daß CHLAMY 1 einen zentralen circadianen Regulator des Chloroplasten-Stoffwechsels darstellt, der insbesondere den Stickstoffwechsel und essentielle Schritte des CO₂-fixierenden Apparates und der Photosynthese kontrollieren könnte. Einige Zielgene werden

dabei in jedem Fall transkriptional reguliert, wie es bei *cah1* der Fall ist (Fujiwara *et al.*, 1996), andere gegebenenfalls sogar transkriptional und translational wie *gs2* und *lip-36G1*.

4.5 Circadiane Regulation der ASL-Aktivität

Die Bindung des CCTR an den *lbp* 3'-UTR korreliert negativ mit der circadianen Expression des LBP-Proteins (Mittag *et al.*, 1994). Daher liegt die Vermutung nahe, daß der CCTR ein circadianer Regulator der Translation des LB-Proteins sein könnte. Es stellte sich somit die Frage, ob es durch die Bindung von CHLAMY 1 an die „UG“-Repetitionen der acht identifizierten Ziel-mRNS zu einer Beeinflussung ihrer Translation und in der Folge zu einer circadianen Expression der jeweiligen Proteine kommt. Eine Oszillation der Proteinmenge eines Enzyms sollte sich, sofern nicht noch posttranslationale Modifikationen eine Rolle spielen, wiederum in einer entsprechenden Schwankung der Enzymaktivität widerspiegeln. Da CHLAMY 1 die höchste Affinität zu den „UG“-Repetitionen von *gs2* und *arg7* hatte, war für die beiden Enzyme GS2 bzw. ASL eine Regulation der Proteinsynthese und in der Folge auch der Aktivität denkbar. Die Messung der GS2-Aktivität stellte sich als sehr schwierig dar, da *C. reinhardtii* neben der plastidären Form (GS2) auch eine cytosolische Form (GS1; enthält keine „UG“-Repetition im 3'-UTR) aufweist, so daß vorab eine chromatographische Trennung beider Isoenzyme nötig gewesen wäre. Einfacher sollten dagegen Enzymtests mit der ASL realisierbar sein, da diese in *C. reinhardtii* nur in einer vermutlich im Zytosol lokalisierten Form vorliegt (Auchincloss *et al.*, 1999).

Zellen, die in einem Licht/Dunkelzyklus kultiviert worden waren, zeigten eine deutliche, wenn auch nicht sehr starke Tag/Nachtregulation der ASL-Aktivität mit einer Amplitude von ~1,6. Die Aktivität hatte ihr Maximum zu Beginn des Tages (LD2) und fiel dann kontinuierlich ab, um zu Beginn der Nachtphase (LD10-LD14) ihr absolutes Minimum zu erreichen; ab der Mitte der Nacht war dann ein erneutes Ansteigen der Aktivität zu beobachten. Setzt man die Enzymaktivität in Beziehung zur Bindeaktivität von CHLAMY 1 (Abb. 2), so fällt auf, daß sich

Enzymaktivität und Bindeaktivität genau gegenläufig verhalten. Zu Zeitpunkten höchster ASL-Aktivität ist die Bindeaktivität von CHLAMY 1 minimal, während sie zu Zeitpunkten minimaler Enzymaktivität ihr Maximum erreicht. Eine plausible Hypothese für dieses Verhalten ist die Erklärung, daß CHLAMY 1 die Translation der mRNS-Moleküle, an die es bindet, reprimiert. Diese Hypothese wird durch Daten eines GUS-Reporter-Gen-Experiments (Schneid, 2002) bekräftigt: *in vitro*-Transkripte von chimären Konstrukten aus dem β -Glucuronidase-Gen und dem 3'-Ende von *gs2* bzw. seiner mutierten Version *gs2_{mut}* (pAB1) wurden unter Zugabe einer mit CHLAMY 1 angereicherten Ammoniumsulfat-Fraktion *in vitro* translatiert. Die translationale Effizienz wurde anschließend anhand der β -Glucuronidase-Aktivität bestimmt. Es zeigte sich, daß das *gs2_{wt}*-Konstrukt in Gegenwart von CHLAMY 1 um bis zu 30 % (durchschnittlich ~23%) schlechter translatiert wurde, als das *gs2_{mut}*-Konstrukt. CHLAMY 1 stellt somit offenbar ein analoges Molekül zum CCTR dar, für den ebenfalls Repressoreigenschaften postuliert wurden.

Die Bestimmung der ASL-Aktivität bei Zellen, die unter Dauerschwachlicht (LL) kultiviert worden waren, zeigte eine noch deutlichere Regulation mit einer Amplitude von ~3. Die Aktivität hatte ihr Maximum zu Beginn des subjektiven Tages (LL26) und fiel dann kontinuierlich bis zum Ende der subjektiven Nacht ab, um zu Beginn des nächsten subjektiven Tages wieder auf ein Maximum zu steigen. Die Annahme, daß CHLAMY 1 als Repressor der Translation fungiert, deckt sich mit der Beobachtung, daß die Enzymaktivität unter konstanten Bedingungen eine deutliche negative Korrelation zu der Bindeaktivität von CHLAMY 1 unter konstanten Bedingungen (Abb. 2) zeigt. Zu Zeitpunkten höchster ASL-Aktivität (LL26 bzw. LL50) ist die Bindeaktivität von CHLAMY 1 minimal, während sie zu Zeitpunkten minimaler Enzymaktivität (LL42-46) ihr Maximum erreicht. Ein Vergleich der Enzymaktivität unter LD und LL zeigt, daß in einem Licht/Dunkelwechsel die Regulation mit einem Faktor von ~1,6 offenbar schwächer ausgeprägt ist, als unter konstanten Bedingungen mit einem Faktor von ~3. Ferner ist unter LD ein Anstieg der Aktivität schon in der Mitte der Nachtphase zu beobachten, während unter LL die Aktivität zwischen dem Ende der subjektiven Nacht und dem Beginn des subjektiven Tages rapide vom

Minimalwert auf den Maximalwert ansteigt. Dieser Verlauf spiegelt sich zum Teil, unter umgekehrten Vorzeichen, auch in der Bindeaktivität von CHLAMY 1 wieder: während unter LD die CHLAMY 1 Bindeaktivität eine stetige Abnahme über die Nachtphase zeigt, ist unter LL ein sehr schneller Abfall am Ende der Nachtphase zu verzeichnen.

Die negative Korrelation zwischen CHLAMY 1-Bindung und der Aktivität der ASL ist offensichtlich. Die deutlich höheren Amplituden bei dem Verlauf der Bindeaktivitäten von CHLAMY 1 (Faktor 5-10) deuten jedoch schon an, daß noch andere Faktoren einen Einfluß auf die Aktivität der ASL nehmen. In diesem Zusammenhang können die mRNS-Stabilität und die Proteinstabilität von großer Bedeutung sein, jedoch kann auch eine Einflußnahme anderer, gegebenenfalls circadian unabhängiger Regulationsmechanismen, die nur unter LD oder LL zum Tragen kommen, nicht ausgeschlossen werden.

4.6 Expression der *arg7*-mRNS in *C. reinhardtii*

Jacobshagen *et al.* (2001) untersuchten die Expression von einigen Genen in *C. reinhardtii*. Sie stellten fest, daß die Transkription vieler, aber nicht aller dieser Gene circadian kontrolliert wird. Die von ihnen ermittelten Schwankungen der mRNS-Menge lagen zwischen Faktor zwei und Faktor zehn. Zur Aufklärung des Mechanismus circadianer Regulation der ASL mußte somit die Aufmerksamkeit auch auf eine etwaige circadiane Expression der mRNS gerichtet werden. Dazu wurde die relative Menge der *arg7*-mRNS zu verschiedenen circadianen Zeiten über zwei verschiedene Methoden bestimmt. Da die *arg7*-mRNS sehr schwach exprimiert wird (Debuchy *et al.*, 1989), wurde zunächst eine semiquantitative PCR ausgearbeitet.

Zellen aus einem LD-Zyklus zeigten im Verlauf der Nacht einen Anstieg der mRNS-Menge, die ihr Maximum gegen Ende der Nacht bis Beginn des Tages (LD22-LD2) erreichte. Mit einer zeitlichen Verschiebung von ca. 1 h erreicht auch die ASL-Aktivität zu Beginn des Tages (LD2) ihr Maximum. Die Amplituden beider Schwingungen liegen mit einem Faktor von jeweils ~2 auch in der gleichen Größenordnung. Gegen Ende der Tagphase (LD10) ist bei der

mRNS-Menge ein zweites schwächeres Maximum zu beobachten, daß sich jedoch nicht in einem entsprechenden Anstieg der Enzymaktivität widerspiegelt. Da sich keine plausible Erklärung für diesen Anstieg finden ließ, sollte die Quantifizierung der mRNS durch eine „Northern“-Hybridisierung überprüft werden.

Das Ergebnis der „Northern“-Hybridisierung zeichnete ein deutlich anderes Bild. Vom Beginn der Tagphase bis zum Ende der Nachtphase war ein kontinuierlicher Anstieg der mRNS-Menge zu verzeichnen. Das Maximum wurde gegen Ende der Nacht (LD18-22) erreicht, während ein zweites Maximum zu LD10 nicht zu beobachten war. Die Amplitude der Schwingung lag mit einem Faktor von $\sim 1,7$ ebenfalls ähnlich hoch wie die der Enzymaktivität. Eine Korrelation zwischen den Schwingungen von mRNS und Enzymaktivität ist somit zwar zu erkennen, jedoch weist die Schwingung der Enzymaktivität eine um 4-6 h nach hinten verschobene Phase auf. Diese recht deutliche Phasenverschiebung erscheint nicht ungewöhnlich für ein circadianes System: so zeigt sich bei *frq* (*N. crassa*) bzw. *tim* und *per* (*D. melanogaster*) ebenfalls eine Phasenverschiebung von ca. 4 h zwischen dem Maximum der mRNS-Menge und dem Maximum der jeweiligen Proteinmenge (Dunlap, 1999).

Die Daten aus der „Northern“-Hybridisierung und der semiquantitativen PCR führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen. Beim Versuch einer Bewertung beider Methoden ist ein Aspekt besonders in den Vordergrund zu stellen: Beide Methoden zeigten übereinstimmend eine sehr schwache Regulation der mRNS um den Faktor 2. Für die Quantifizierung so geringer Schwankungen durch eine „Northern“-Hybridisierung sind in jedem Fall mehrere Wiederholungen des Experiments nötig, um eine ausreichende statistische Absicherung der Ergebnisse zu gewährleisten. Eine andere Problematik zeigt in diesem Zusammenhang die Quantifizierung durch eine semiquantitative PCR:

Eine quantitative PCR setzt voraus, daß die Amplifikation im exponentiellen Bereich der PCR erfolgt. Erst dadurch ist sichergestellt, daß die Zahl der Ausgangsmoleküle in einem linearen Zusammenhang zur Zahl der amplifizierten Moleküle steht. Dieser Zusammenhang wird durch folgende Formel beschrieben:

$$N = N_0 (1 + E)^n$$

N = Zahl der amplifizierten Moleküle

N_0 = Zahl der Ausgangsmoleküle

E = Amplifikations-Effizienz

n = Zahl der Zyklen

Die Gleichung verdeutlicht auch, daß geringste Abweichungen in der Amplifikations-Effizienz, wie sie durch Verunreinigungen in der RNS-Präparation oder inhomogene Temperaturprofile im Thermoblock des PCR-Gerätes zustande kommen, sich in der PCR potenzieren. Mit steigender Anzahl der Zyklen wird dieser Effekt immer gravierender. Um diese Störeinflüsse auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die für einen Zyklus verwendeten mRNA aus den Zellen einer Kultur unter exakt den gleichen Bedingungen isoliert. Bei der Amplifikation wurden immer nur zentrale Positionen im Thermoblock benutzt, da dort die Temperaturhomogenität am höchsten ist. Darüber hinaus sollte, nicht zuletzt durch die Normalisierung auf die koamplifizierte 18S-rRNA als internen Standard, die relative Quantifizierung gewährleistet sein.

Trotz dieser Maßnahmen war bei einer Endpunktbestimmung, wie sie hier durchgeführt wurde, eine zuverlässige Unterscheidung von geringen Unterschieden bei der Anzahl der mRNA-Ausgangsmoleküle (≤ 2) nicht mehr sichergestellt (Sambrook & Russell, 2001). Geringe Schwankungen der *arg7* mRNA-Menge, wie sie unter LD zu beobachten sind, lassen sich durch die PCR also nicht mehr exakt quantifizieren. Unter diesem Aspekt ist auch die Quantifizierung der mRNA aus Zellen eines LL-Zyklus durch die PCR mit Vorbehalt zu betrachten.

Auch unter konstanten Bedingungen (LL) zeigt der Kurvenverlauf der *arg7*-mRNA-Menge zwei Maxima. Von einem Maximalwert zu Beginn des subjektiven Tages nimmt die mRNA-Menge schnell bis zur Mitte des Tages ab, um dann langsam wieder anzusteigen und zur Mitte der Nacht ein zweites Maximum zu erreichen. Gegen Ende der Nacht ist dann ein nochmaliger Abfall auf einen Minimalwert zu erkennen, ehe wieder der Anstieg zu Beginn des nächsten Tages erfolgt. Die Amplitude der Schwingung liegt dabei mit einem Faktor von 1,8 in der gleichen Größenordnung wie unter LD. Eine Relation zu der Aktivität der ASL ist wiederum kaum zu erkennen, da der Verlauf der Enzymaktivität lediglich

ein Maximum zu Beginn des subjektiven Tages zeigt. Eine „Northern“-Hybridisierung zur Überprüfung der Daten aus der semiquantitativen PCR konnte jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

Die Frage nach einer circadianen Regulation der *arg7*-mRNS kann somit nicht eindeutig beantwortet werden. Eine Regulation unter konstanten Bedingungen scheint durchaus möglich, jedoch ist sie dann offenbar nicht sehr stark ausgeprägt.

4.7 Bedeutung der „UG“-Repetition im 3'-UTR für die circadiane Regulation der ASL-Aktivität *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die *arg7*-mRNS im 3'-UTR eine Bindestelle für CHLAMY 1 trägt und daß die Aktivität der ASL circadian reguliert ist. Um die Auswirkung der Bindung von CHLAMY 1 an die „UG“-Repetition für die circadiane Regulation der ASL-Aktivität *in vivo* zu zeigen, wurde ein *arg7*⁻ Stamm mit einem *arg7*-Gen, dem die „UG“-Repetition fehlt, transformiert. Die Regulation der ASL-Aktivität der transformierten Zellen sollte dann Aufschluß über den Einfluß der „UG“-Repetition auf die circadiane Regulation geben.

Für die Transformationsexperimente stand ein Plasmid (pJD67), das das *arg7*-Gen enthält, zur Verfügung. Eine Restriktionsanalyse zeigte, daß, verglichen mit der in „GenBank“ hinterlegten genomischen Sequenz des *arg7*-Gens (Acc.No.: X16619), die ersten ~905 Basen fehlten. Diese Deletion sollte die Translation des intakten Enzyms jedoch nicht beeinträchtigen, da die Sequenz damit 1507 Bp vor dem Startcodon und 1228 Bp vor dem Beginn des 5'-UTR einsetzte. Ob und inwieweit die Deletion den Promotor des Gens beeinträchtigte, war jedoch aufgrund unzureichender Charakterisierung der Promotor-Region nicht zu beurteilen. Die kodierende Sequenz, einschließlich 5'-UTR und 3'-UTR mit „UG“-Repetition und Poly(A)-Signal, war aber vollständig, was auch bereits mehrfach durch die erfolgreiche Komplementierung von *arg7*⁻ Stämmen durch Transformation mit dem Plasmid gezeigt worden war (Debuchy *et al.*, 1989).

Aufgrund der Größe (11,08 kBp) des Plasmids JD67 war eine direkte Mutagenese der „UG“-Repetition nicht möglich. Es wurde somit eine Strategie zur Subklonierung des 3'-Endes des *arg7*-Gens erarbeitet. Nach erfolgreicher Mutagenese der (UG)₇-Repetition wurden die einzelnen Genfragmente wieder zum vollständigen Gen religiert. Um sicherzustellen, daß das Bindemotiv für CHLAMY 1 vollständig zerstört worden war, wurde im „mobility shift“-Experiment die CHLAMY 1-Bindung untersucht. Widererwartend zeigte sich, daß noch eine schwache Bindung möglich war. Die Ursache hierfür war offenbar in den verbliebenen vier „UG“-Elementen, die die Sequenz links und rechts flankierten, zu suchen. Darüber hinaus schloß sich ein 24 Basen langer Bereich mit einem auffällig hohen Guanosin-Gehalt (79 %) „upstream“ der mutagenisierten „UG“-Repetition an. Es bestand die Möglichkeit, daß dieser Bereich, zusammen mit den verbliebenen zwei „UG“-Elementen, als schlechtes Bindemotiv für CHLAMY 1 diente und/oder eine entscheidende Bedeutung für die Stabilisierung der Sekundärstruktur des Bindemotivs hatte. Um die restliche Bindeaktivität von CHLAMY 1 vollständig zu eliminieren, wurden durch einen Restriktionsverdau ein (UG)₂-Element und die guanosinreiche Sequenz deletiert. Nachfolgende „mobility shift“- und „UV-crosslinking“-Experimente mit einem *in vitro*-Transkript zeigten, daß CHLAMY 1 nun keine Affinität mehr zu dem so modifizierten 3'-Ende hatte.

Zellen eines *arg7*⁻ Stamm wurden durch das mutagenisierte Plasmid bzw. das Ausgangs-Plasmid mit dem Wildtyp-Gen als Positivkontrolle transformiert. Die Integration von DNS, die in *C. reinhardtii* eingeführt wird, erfolgt in der Regel durch heterologe Rekombination (Rochaix, 1995), was eine Reihe von Konsequenzen mit sich bringt, die zu berücksichtigen sind. Die ungerichtete Integration des Gens kann zum einen an *loci* erfolgen, die keine relevante genetische Information tragen, mit der Folge, daß die transformierte Zelle ein relativ normales Wachstum zeigt. Zum anderen kann die Integration zur Beeinträchtigung eines relevanten Gens führen, was dann ein verlangsamtes Zellwachstum oder sogar den Zelltod zur Folge haben kann. Für die weitere Charakterisierung wurden daher nur die schnellwachsenden Klone (Koloniebildung nach sieben bis zehn Tagen) herangezogen. Zunächst sollte

durch „Southern“-Analysen sichergestellt werden, daß die Integration des Gens jeweils nur einmal pro Zelle und auch vollständig erfolgt, also auch mit den regulatorischen Elementen in 5'-UTR und 3'-UTR. Um die Zahl der Klone, die lohnend für eine detaillierte Charakterisierung erschienen, einzugrenzen, wurde zunächst die ASL-Aktivität zu LD2 und LD14 bestimmt. Die mit dem Wildtyp-Gen transformierten Zellen sollten dabei eine dem Wildtyp ähnliche, circadiane Regulation der Enzymaktivität zeigen. Zellen, die mit dem mutierten Gen transformiert worden waren, sollten dagegen eine deutlich andere Regulation zeigen. Vorausgesetzt, daß die circadiane Regulation der ASL-Aktivität nur über die Repression der Translation in der Nacht erfolgt, sollte bei diesen Klonen eine konstant hohe Enzymaktivität über den Tag/Nachtverlauf zu beobachten sein. In Abhängigkeit von der Stabilität der ASL war jedoch auch eine kontinuierliche Zunahme möglich. Wie die Daten zur Transkription der *arg7*-mRNS zeigten, ist jedoch auch eine circadiane Regulation der mRNS-Menge möglich, so daß nicht zwangsläufig ein Wegfall der circadianen Regulation, wohl aber eine Abschwächung zu erwarten wäre. Wie die Auswertung der Enzymaktivitäten ergab, zeigte sich bei beiden Transformationstypen ein sehr uneinheitliches Bild. Die Wildtyp-Zellen zeigten zum Teil eine ganz ähnliche Regulation wie der Wildtyp-Stamm, d. h. mit einer höheren Aktivität in der Tagphase. Bei einigen schien die Regulation aber auch gänzlich aufgehoben, und bei anderen wiederum verhielt sie sich gegenläufig, d. h. mit einem Maximum der Aktivität in der Nachtphase. Bei diesen Zellen war das Wildtyp-Gen u. U. ohne die „UG“-Repetition integriert, sodaß die circadiane Kontrolle der ASL-Aktivität verändert oder gänzlich aufgehoben war. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Regulation der mit dem mutierten Konstrukt transformierten Zellen. Von zehn untersuchten Kulturen waren nur drei potentiell rhythmisch, d. h. mit einer unterschiedlichen Aktivität zwischen Tag- und Nachtphase. Zwei dieser Kulturen hatten offenbar eine dem Wildtyp ähnliche Regulation (Maximum der Aktivität zu LD2), während sich die Regulation bei der dritten Kultur gegenläufig verhielt (Maximum zu LD14). Die übrigen transformierten Zellen zeigten dagegen offenbar eine Zu- oder auch Abnahme der Aktivität oder eine konstante bzw. nicht erkennbar regulierte Aktivität.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse steht vor allem die Frage nach dem Ort, der Vollständigkeit und der Häufigkeit der Integration des mutierten Gens im Vordergrund. Durch die heterologe Rekombination bei der Transformation kann das Gen an beliebige Stellen im Genom integrieren, mit unterschiedlichsten Auswirkungen auf die Expression. Die Integration hinter einem konstitutiven Promotor führt erwartungsgemäß zu einer anderen Regulation, als z. B. die Integration hinter einem lichtregulierten Promotor. Ferner können, wie bereits erwähnt, unvollständige bzw. mehrfache Integrationen zu sich überlagernden Effekten führen.

Eine Auswahl der so vorab charakterisierten Klone sollte im nächsten Schritt daher einer genauen genomischen Charakterisierung unterzogen werden. Diese Arbeiten wurden von Frau Susanne Zollner im Rahmen einer Zulassungsarbeit fortgesetzt.

4.8 Offene Fragen

Die Untersuchungen zur Interaktion der acht neu identifizierten mRNS mit dem RNS-Bindeprotein CHLAMY 1 hat neue Fragen zur Bedeutung der Primär- und Sekundärstruktur des Bindemotivs aufgeworfen. Zum einen bleibt zu beantworten, welche Rolle die Sekundärstruktur des 3'-UTRs für eine hohe Bindeaktivität spielt, und zum anderen, wie diese Struktur aussieht. Eine vertiefte Einsicht hierzu könnten entsprechende Computerberechnungen zur Sekundärstruktur in Verbindung mit gezielter Mutagenese relevanter Bereiche der 3'-UTRs liefern. Ebenso ist noch offen, ob sehr lange „UG“-Wiederholungen oder auch aufeinanderfolgende „UG“-Wiederholungen in der Lage sind, mehrere CHLAMY 1-Moleküle zu binden; in diesem Zusammenhang ist auch von großem Interesse, welche Auswirkung dies wiederum auf die Regulation der Translation hat.

Um das Bild zur circadianen Regulation der ASL abzurunden, ist einerseits die Expression der *arg7*-mRNS unter konstanten Bedingungen zu untersuchen, andererseits sollte ein Antikörper gegen die ASL hergestellt werden, der es

ermöglicht, die Proteinmenge bzw. die Rate der Neusynthese zu verschiedenen circadianen Zeiten zu bestimmen.

Die Analyse der mit *arg7* bzw. *arg7_{mut}* transformierten Zellen wurde bereits von Frau Susanne Zollner fortgesetzt. Sie untersuchte eine Kultur von Zellen, die mit *arg7* und zwei Kulturen von Zellen, die mit *arg7_{mut}* transformiert worden waren. Die Daten sind jedoch noch zu unvollständig, um klare Aussagen bezüglich der Bedeutung der „UG“-Repetition für die circadiane Regulation treffen zu können. Zur Vervollständigung des Bildes empfiehlt sich die Charakterisierung einiger weiterer transformierter Zellen. Darüber hinaus sollte durch Untersuchungen zur Expression der *arg7*-mRNS in den transformierten Zellen eine transkriptionale Regulation durch fremde Promotoren im Integrationsbereich des Gens ausgeschlossen werden.

Neben den exemplarischen Untersuchungen mit der ASL wurden bereits erste Anstrengungen unternommen, die Regulation der Nitritreduktase (NII1) (durch Herrn Jens Grosch) aufzuklären. Eine Ausdehnung der Experimente auf die übrigen Ziel-mRNS bzw. ihre Produkte würde eine sinnvolle Ergänzung der bisherigen Ergebnisse bedeuten.

Im Rahmen des *C. reinhardtii*-„EST Project“ werden fortlaufend neue Gene und ESTs sequenziert und in „GenBank“ (NCBI) hinterlegt. Ein erneutes Sichten dieser Genbank führte bereits zur Detektion weiterer potentieller Ziel-mRNS für CHLAMY 1 und bis zum vollständigen Abschluß des Projekts werden sicherlich nochmals neue dazukommen. Die Produkte dieser mRNS nehmen größtenteils Schlüsselpositionen im Stickstoffwechsel, der CO₂-Fixierung und der Photosynthese ein – und so bleibt zu klären, ob CHLAMY 1 als ein zentraler, circadianer Regulator des Primärstoffwechsels von *C. reinhardtii* betrachtet werden kann.

5 Zusammenfassung

Das Protein CHLAMY 1 aus der Grünalge *C. reinhardtii* bindet circadian kontrolliert an eine 22 Nukleotide lange, „UG“-haltige Region im 3'-UTR der *lbp*-mRNS aus *G. polyedra*. Ziel dieser Arbeit war es, das Motiv für CHLAMY 1 näher zu charakterisieren und Ziel-mRNS in *C. reinhardtii* zu finden, die CHLAMY 1 erkennt.

1. Durch *in vitro*-Mutagenese wurden Elemente der Bindestelle für CHLAMY 1 und dem CCTR im 3'-UTR der *lbp*-mRNS ausgetauscht. *In vitro*-Transkripte der mutierten Sequenz wurden im „mobility shift“-Experiment auf die Bindung von CHLAMY 1 und dem CCTR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die „UG“-haltige Region den zentralen Teil der Bindestelle für beide Proteine darstellt. Für die volle Bindeaffinität der Proteine sind alle sieben „UG“-Elemente sowie die flankierenden Regionen nötig. Geringe Bindeaffinität wird noch mit fünf bis sechs (richtungsabhängig) „UG“-Elementen erreicht. Bei weniger als fünf „UG“-Elementen können beide Proteine nicht mehr binden.
2. Poly(A)⁺RNS von *C. reinhardtii*-Zellen wurde zum Zeitpunkt der maximalen Bindeaktivität von CHLAMY 1 (LD10) geerntet. Aus dieser RNS wurde eine cDNS-Bank mit einem Titer von ~900.000 pfu hergestellt. Die Größe der ligierten cDNS-Fragmente lag zwischen 0,5 und 5 kB. Die cDNS-Bank stellte somit eine repräsentative Kopie der mRNS-Population dar, die am Ende des Tages in der Zelle vorkommt.
3. Aus genomischer DNS bzw. aus cDNS wurden die 3'-Enden von acht *C. reinhardtii*-mRNS amplifiziert, die zwischen sieben und sechzehn „UG“-Elemente in Folge im 3'-UTR tragen. Diese mRNS kodieren vor allem für Proteine, die Schlüsselstellungen im Stickstoff- und CO₂-Stoffwechsel einnehmen.
4. Durch „mobility shift“-Experimente, Wettbewerbsversuche mit dem *lbp*_{wt}- und *lbp*_{mut}-Transkripten und durch „UV-crosslinking“-Experimente wurde

gezeigt, daß CHLAMY 1 spezifisch an die „UG“-Motive aller acht mRNS bindet.

5. Kompetitionsstudien führten zu dem Ergebnis, daß die Affinität von CHLAMY 1 zu den mRNS sehr stark variiert. Es zeigte sich, daß sich zwischen der Anzahl der „UG“-Elemente und der Affinität von CHLAMY 1 kein direkter Zusammenhang herstellen läßt. Die höchste Affinität bestand zu den mRNS, die für Proteine des Stickstoff- und CO₂-Stoffwechsels kodieren.
6. Es wurde gezeigt, daß die Aktivität der Argininosuccinat-Lyase (ASL), Produkt des *arg7*-Gens, circadian reguliert ist. Da die Schwankung der Enzymaktivität in umgekehrter Phase mit der Bindeaktivität von CHLAMY 1 korreliert, wurde die Hypothese aufgestellt, daß CHLAMY 1 als ein Repressor der Translation wirkt.
7. Eine circadiane Regulation der mRNS des *arg7*-Gens konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Die geringe Expression der mRNS und ihre gegebenenfalls sehr schwache Regulation (Amplitude ≤ 2) ließ eine aussagekräftige Quantifizierung nicht zu.
8. Ein *in vivo*-Experiment zum direkten Nachweis der circadian regulierten Translation einer mRNS durch CHLAMY 1 wurde erarbeitet. Dazu wurde durch eine *in vitro*-Mutagenese auf DNS-Ebene die „UG“-Wiederholung im 3'-UTR der *arg7*-mRNS deletiert. Mutiertes Gen und Wildtyp-Gen wurden jeweils in ASL-defiziente *C. reinhardtii*-Zellen transformiert. Durch erste Tests konnten einige Klone ausgewählt werden, die in Zukunft detailliert auf die Regulation der ASL untersucht werden können.

6 Anhang

6.1 Sequenzen der klonierten cDNS-Fragmente

Die Sequenzen sind in 5' → 3' Orientierung dargestellt.

arg7 - 3'-Ende

```
ctggagcagg tgcagaagat ggcacacctac ctggcggcgagg agggacagca
ctgagcgggt cgggggaggagg ggggcgggtg tgtatgtgtg tgtgtgtgctg
tgtgtaagtc tcggtggagg ggtggtcctc tatatggcgagg cggggccaca
gggggacggg tgtgacagag ttacggccgg
```

arg7 - Sonde

```
cccaggc agctgctgct cctgctgaca acactaagaa gctgtggggc
ggtcgcttca cgggcaagac ggacccgctc atggagaagt tcaacgagtc
gctgcccttt gacaagcgcc tgtgggctga ggacatcaag ggcagccagg
cgtacgcca ggtccttgcc aaggccggca ttctggcaca tgacgaggcc
gtgaccattg tggaggggct ggccaagggt gctgaggagt ggaaggcggg
tgcctttgtg atcaaggcgg gtgacgagga catccacacg gccaacgagc
ggcgctcac ggagctggtg ggggcgggtg gcggcaagct gcacaccggc
cgctcgcgca acgaccaggt tgccaccgac taccggctgt ggctggtggg
tcaggtggag gtgatgcggg ccgaggtggg cgagctgatg cgcgtggcgg
cggaccgctc cgaggcagag gtggaggtgc tcatgccggg cttcacgcac
cttcagaatg ccatgactgt gcgctggagc cactggctga tgagccacgc
cgcggcctgg cagcgcgacg acatgcggct gcgggacctg ctgccgcggg
tggccacact gccgctgggg tcgggcgccc tggccggcaa cccctttctg
gtggaccgcc agttcatcgc caaggagtgt ggtttcggcg gcggcgtgtg
ccccaaactc atggacgcgg tgtctgaccg cgactttgtg atcgagacgg
tgtttgcggc cagcctgctg tgcgtgcacc tgcgcgctg ggcgaggagc
ctcatcatct acagctccgg ccccttcggc tacgtgcagt gcagcgacgc
ctacgccacc ggctcctcgc tcatgccgca gaagaagaac cccgacgccc
tgagactcat caggggcaag ggcggctcgtg tgcagggcaa cctgatgggc
gtcatggcgg tgctcaaggg cagccccacc acatacaaca aggacttcca
ggagtgttgg gagctgctgt ttgacacggg ggacacgggt cacgacgtgg
tgcgcacgc caccggcgtg ctgtccaccc tgcggatcaa gcccgaccgc
atgaaggccg gcctgtccgc cgacatgctc gccacggact tggccgagta
cctggtgctg aaggcggtgc cgttccggga gacacaccac cacagcggcg
ccgcccgtgaa gatggccgag gaccgcgggt gcacgctgtt cgacctcacc
gtggacgacc tcaagaccat ccaccgctc ttcaccgacg acgtggcggc
ggtgtgggac ttcaaccgca gcgccgagat gcgcgacacg gagggcggca
ccagcaagcg ctcggtgctg gagcaggtgc agaagatgcg cacctacctg
gcggcggagg gacagcactg agcgggtcgg gggaggg
```

gs2 - 3'-Ende

cgtgactcgg atgtgagctg tgatgagggg gttgcttcta tccgctaagg
 gtgtgtgtgt gtgtgtctgt ctatgctggg ccgggtatgt ggaccggcga
 cctgacgttt ggaatgcgtg cgtgtg

lip-36G1 - 3'-Ende

aacagctgct gttgcgcacg cggcgcaagg cgcaacctcc tggcatgaca
 acatggctca aaaggtgtca cgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtttgtgtg
 tgcgtgtgga gagtctggca taggtagatg tggtcgttag ctt

lpcr-1 - 3'-Ende

tgccgtgtgc gtgacaggag ccggcgcagc gctgggttgc aggtgtgtgt
 gtgtgtgcag gggcggaccc ggggcagtcc tagcatgcgg gcccatgcgg
 ctggctgttg ttgctgttg

nii1 - 3'-Ende

gctgtggttc tttaccctcg ttttacatat gcgttgctgt gttccttgtg
 tgtatgtacg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta cgggtgtgtat acggcgtgcg
 gggcaggcag gcggaggctg caaagggagc gcagatg

nrt2;3 - 3'-Ende

gcttcttcat cggcctcagc ctctgcatgt tcgtgtgctg tgagtaatgc
 gtgcatgtct tacatagcgc cacatgcgtt gcgtgcgttt gtgtgtgtgt
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt ggtacc

rbcS1 - 3'-Ende

gctcgtcgat ctgagccgtg tgtgatgttt gttggtgttt gagcgagtgc
 aatgagagtg tgtgtgtgtg tgttgttggg gtgtggctaa gccaaagcgtg
 atcgcgatgac gcaagga

rps18 - Sonde

ggtggtaaaa ttttaccacg aagacaaaca cgtttaacag caaaacaaca
 acgttttgtt gcaaaaacta ttaaaactgc acgtgtaatg ggcttggttac
 cgtttggttag taaagaacgc agttttttta aataaacaata tccagtgtta
 taaaaaactt gctaagtact taaatctcag cgaaagctag atatcgattt
 atctactagt attgtcttaa tagaaaaaag ttattaatag aaaagaaaaa
 tataaaaaatc aatagtggat tttgaataga aattgaatgc cttacaaact
 tttctgcttc agacacataa taagttagag ataaccctt tatggcataa
 atgtctttgt tatgtggcag ccccgaaagg gaagtctact aa

yptC4 - 3'-Ende

gcaagtagtc agtaccgcac cggtagcgag ggtttgtgat gcgatggagg
tgtgtctgtg tgtgtgtgtg agtgcattgg gctcatctgg cttgcaggct
gttggttgg

7 Literaturverzeichnis

Abrahams, J.P., Van den Berg, M., Van Batenburg, E., Pleij, C. (1990). Prediction of RNA secondary structure, including pseudonotting, by computer simulation. *Nucl. Acids Res.* **18**, 3035-3044

Atteia, A., Wetterskog, D., Gutierrez-Cirlos, E.-B., Franzen, L.-G. Gonzalez-Halphen, D. The genomic sequences of the genes encoding mitochondrial cytochrome c1 and the Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. **unveröffentlicht**

Auchincloss, A.H., Loroach, A.I., Rochaix, J.D. (1999). The argininosuccinate lyase gene of *C. reinhardtii*: cloning of the cDNA and its characterization as a selectable shuttle marker. *Mol. Gen. Genetics* **261**, 21-30

Bruce, V.G. (1972). Mutants of the biological clock in *C. reinhardtii*. *Genetics* **70**, 537-548

Bruce, V.G., Bruce, N.C. (1978). Diploids of clock mutants of *C. reinhardtii*. *Genetics* **89**, 225-233

Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.

Byrne, T.E., Wells, M.R., Johnson, C.H. (1992). Circadian rhythms of chemotaxis to ammonium and of methylammonium uptake in *C. reinhardtii*. *Plant Physiol.* **98**, 879-886

Chen, Q., Siflow, C.D. (1996). Isolation and characterization of glutamine synthetase genes in *C. reinhardtii*. *Plant Physiol.* **112**, 987-996

- Chen, Z.Y., Lavigne, L.L., Mason, C.B., Moroney, J.V.** (1997). Cloning and overexpression of two cDNAs encoding the low-CO₂-inducible chloroplast envelope protein LIP-36 from *C. reinhardtii*. *Plant Physiol.* **114**, 265-273
- Davies, J.P., Weeks, D.P., Grossman, A.R.** (1992). Expression of the arylsulfatase gene from the β_2 -tubulin promotor in *C. reinhardtii*. *Nucl. Acids Res.* **20**, 2959-2965
- Debuchy, R., Purton, S., Rochaix, J.D.** (1989). The argininosuccinate lyase gene of *C. reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J.* **8**, 2803-2809
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Bio. Reporter* **1**: 19-21
- De Mairan, J.** (1729). in: *Observation Botanique Histoire de L'Academic Royale des Sciences*, Paris. 35-36
- Deng, W.P., Nickoloff, J.A.** (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Analyt. Biochem.* **200**, 81-88
- Dietmaier, W., Fabry, S., Huber, H., Schmitt, R.** (1995). Analysis of a family of *ypt* genes and their products from *C. reinhardtii*. *Gene* **158**, 41-50
- Dunlap, J.C., Hastings, J.W.**, (1981). The biological clock in *G. polyedra* controls luciferase activity by regulating turnover. *J. Biol. Chem.* **268**, 8842-8850
- Dunlap, J.C.** (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290
- Emery, P., So, V., Kaneko, M., Hall, J.C., and Rosbash, M.** (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* **95**, 669-679

- Feldman, J.F., Hoyle, M.** (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**, 605-613
- Foster, R.G.** (1998). Shedding light on the biological clock. *Neuron* **20**, 829-833
- Fritz, L., Morse, D., Hastings, J.W.** (1990). The circadian bioluminescence rhythm of *G. polyedra* is related to daily variations in the number of light-emitting organelles. *J. Cell. Sci.* **95**, 321-328
- Fujiwara, S., Ishida, N., Tsuzuki, M.** (1996). Circadian expression of the carbonic anhydrase gene, *Cah 1*, in *C. reinhardtii*. *Plant. Mol. Biol.* **32**, 745-749
- Fukuzawa, H., Miura, K., Ishizaki, K., Kucho, K., Saito, T., Kohinata, T., Ohyama, K.** (2001). *Ccm1*, a regulatory gene controlling the induction of a carbon-concentrating mechanism in *C. reinhardtii* by sensing CO₂ availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5347-5352
- Goldschmidt-Clermont, M., Rahire, M.** (1986). Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in *C. reinhardtii*. *J. Mol. Biol.* **191**, 421-432
- Gorman, D.S., Levine, R.P.** (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *C. reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 1665-1669
- Groß, J. Hardeland, R., Wolf, R.** (1994). Circadian rhythms of tyrosine aminotransferase activity in *G. polyedra*. *Biol. Rhythm Res.* **25**, 51-58

Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K., Sogin, M.L. (1987). Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5823-5827

Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-3

Harris, E.H. (1989). in *C. reinhardtii* Handbook (Academic, New York), pp. 47, 593-594

Helfrich-Forster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J.C., Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* **30(1)**, 249-261

Hoffmanns-Hohn, M., Martin, W., Brinkmann, K. (1984). Multiple periodicities in the circadian system of unicellular algae. *Z. Naturforsch.* **39c**, 791-800

Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A., Haskins, C.P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolisms of microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.* **94**, 152-170

Hwang, S., Kawazoe, R., Herrin, D.L. (1996). Transcription of *tufA* and other chloroplast encoded genes is controlled by a circadian clock in *C. reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 996-1000

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. (1990). *PCR Protocols*, Academic Press

- Jacobshagen, S., Johnson, C.H.** (1994). Circadian Rhythms of gene expression in *C. reinhardtii*: circadian cycling of mRNA abundance of *cab II*, and possibly of β -tubulin and cytochrome c. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 142-152
- Jacobshagen, S., Kindle, K.L., Johnson, C.H.** (1996). Transcription of *cab II* is regulated by the biological clock in *C. reinhardtii*. *Plant. Mol. Biol.* **31**, 1173-1184
- Jacobshagen, S., Whetstine, J.R., Boling, J.M.** (2001). Many but not all genes in *C. reinhardtii* are regulated by the circadian clock. *Plant Biol.* **3**, 592-597
- Jaffrey, S.R., Haile, D.J., Klausner, R.D., Harford, J.B.** (1993). The interaction between the iron-responsive element binding protein and its cognate RNA is highly dependent upon both RNA sequence and structure. *Nucl. Acids Res.* **21**, 4627-4631
- Jerpseth, J., Greener, A., Short, J.M., Viola, J., Kretz, P.L.** (1992). XL1-Blue MRF' *E. coli* cells: McrA⁻, McrCB⁻, McrF⁻, Mrr⁻, HsdR⁻ derivative of XL1-Blue cells. *Strategies* **5**, 81-83
- Johnson, C.H., Roeber, J., Hastings, J.W.** (1984). Circadian changes in enzyme concentration account for rhythm of enzyme activity. *Science* **223**, 1428-1430
- Johnson, C.H., Kondo, T., Goto, K.** (1992). Circadian rhythms in *C. reinhardtii*. In circadian clocks from cell to human (Hiroshige, T. and Honma, K. eds.), Sapporo: Hokkaido University Press, 139-155
- Kindle, K.L.** (1990). High frequency nuclear transformation of *C. reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1228-1232

Kondo, T., Strayer, C.A., Kulkarni, R.D., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S.S., Johnson, C.H., (1993). Circadian rhythms in prokaryotes Luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **90**, 5672-5676

Konopka, R.J., Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 2112-2116

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685

Lee, D.-H., Mittag, M., Sczekan, S., Morse, D., Hastings, J.W. (1993). Molecular Cloning and Genomic Organisation of a Gene for Luciferin-binding Protein from the Dinoflagellate *G. polyedra polyedra*. J. Biol. Chem. **268**, 8842-8850

Li, J., Timko, M.P. (1996). The *pc-1* phenotype of *C. reinhardtii* results from a deletion mutation in the nuclear gene for NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. Plant Mol. Biol. **30**, 15-37

Liang, P., Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science **257**, 967-971

Liu, Y., Tsinoremas, N.F., Johnson, C.H., Lebedeva, N.V., Golden, S.S., Ishiura, M., Kondo, K. (1995). Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. Genes Dev. **9**, 1469-1478

Loppes, R., Matagne, R., Strijkert, P.J. (1972). Complementation at the *arg7* locus in *C. reinhardtii*. Heredity **28**, 239-251

- Lübke, K., Schröder, E., Kloss, G.** (1975). Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine II. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 177-178
- Majercak, J., Kalderon, D., Edery, I.** (1997). *Drosophila melanogaster* deficient in protein kinase. A manifests behavior-specific arrhythmia but normal clock function. Mol. Cell. Biol. **17**, 5915-5922
- Marcovic, P., Roenneberg, T., Morse, D.** (1996). Phased protein synthesis at several circadian times does not change protein levels in *G. polyedra*. J. Biol. Rhythms **11**, 57-67
- McClung, C.R.** (2001). Circadian rhythms in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. **52**, 139-162
- Memon, A.R., Hwang, S., Deshpande, N., Thompson, G.A., Herrin, D.L.** (1995). Novel aspects of the regulation of a cDNA (*Arf1*) from *C. reinhardtii* with high sequence identity to animal ribosylation factor 1. Plant. Mol. Biol. **29**, 567-577
- Mitchell, D.R., Brown, K.S.** (1997). Sequence analysis of the *C. reinhardtii* flagellar dynein gene. Cell Motil. Cytoskeleton **37**, 120-126
- Mittag, M.** (1996). Conserved circadian elements in phylogenetically diverse algae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14401-14404
- Mittag, M., Eckerskorn, C., Strupat, K., Hastings, W.** (1997). Differential Translation initiation of *lbp* mRNA is caused by a 5' upstream open reading frame . FEBS Lett. **411**, 245-250
- Mittag, M., Hastings, J.W.** (1996). Exploring the signaling pathway of circadian bioluminescence. Physiol. Plant. **96**, 727-732

- Mittag, M., Lee, D.-H., Hastings, J.W.** (1994). Circadian expression of the luciferin-binding protein correlates with the binding of a protein to the 3' untranslated region of its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5257-5261
- Mittag, M., Li, L.M., Hastings, J.W.** (1998). The mRNA level of the circadian regulated *Gonyaulax* luciferase remains constant over the cycle. *Chronobiol. Int.* **15**, 93-98
- Mittag, M., Waltenberger, H.** (1997). *In vitro* mutagenesis of binding site elements for the clock-controlled proteins CCTR and Chlamy 1. *Biol. Chem.* **378**, 1167-1170
- Moore, R.Y., Eichler, V.B.** (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-206
- Morse, D., Fritz, L., Hastings, J.W.** (1990). What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. *TIBS* **15**, 262-265
- Morse, D., Milos, P.M., Roux, E., Hastings, J.W.** (1989a). Circadian regulation of bioluminescence in *G. polyedra* involves translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 172-176.
- Morse, D., Pappenheimer, A.M., Hastings, J.W.** (1989b). Role of the luciferin-binding protein in the circadian bioluminescent reaction of *G. polyedra*. *J. Biol. Chem.* **264**, 11822-11826
- Nikaido, S.S., Johnson, C.H.** (2000). Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *C. reinhardtii*. *Photochem. Photobiol.* **71**, 758-765

- Pajuelo E., Pajuelo, P., Clemente, M.T., Márquez, J.** (1995). Regulation of the expression of ferredoxin-nitrite reductase in synchronous cultures of *C. reinhardtii reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1249**, 72-78
- Perron, K., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.D.** (1999). A factor related to pseudouridine synthases is required for chloroplast group II intron trans-splicing in *C. reinhardtii*. *EMBO J.* **18**, 6481-6490
- Pittendrigh, C.S., Caldarola, P.C.** (1973). General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2697-2701
- Promega** (1996). *Protocols and Applications Guide*. 3rd Edition
- Quesada, A., Gómez, I., Fernández, E.** (1998b). Clustering of the nitrite reductase gene, a light regulated gene with nitrate assimilation loci in *C. reinhardtii*. *Planta* **206**, 259-265
- Quesada, A., Hidalgo, J., Fernández, E.** (1998a). Three *nrt2* genes are differentially regulated in *C. reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 373-377
- Ramalho, C.B., Hastings, J.W., and Colepicolo, P** (1995). Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *G. polyedra* is due to cellular protein levels. *Plant Physiol.* **107**, 225-231
- Renn, S.C.P., Park, J.H., Rosbash, M., Hall, J.C., Taghert, P.H.** (1999). A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in drosophila. *Cell* **99**, 83-95
- Rochaix, J.D.** (1995). *C. reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 209-230

Salvador, M.L., Klein, U., Bogorad, L. (1998). Endogenous fluctuations in the chloroplast of *C. reinhardtii*. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7235-7242

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Cold spring harbor laboratory press

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual* (third edition). Cold spring harbor laboratory press

Schneid, C. (2002). CHLAMY 1, ein circadianes RNS-Bindeprotein aus *Chlamydomonas reinhardtii*: Isolierung, Klonierung der Gene und phylogenetische Analysen. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Selby, C.P., Thompson, C., Schmitz, T.M., Van Gelder, R.N., Sancar, A. (2000). Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14697-14702

Sogin, M.L. (1994). The origin of eucaryotes and evolution into major kingdoms. In *early Life on Earth*. Nobel Symposium No. **84**, S. Bengtson, ed. (New York: Columbia Univ. Press), 181-192

Stephan, F.K., Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1583-1586

Stratagene, ZAP-cDNA® Synthesis Kit and ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit, Instruction Manual

- Sueoka, N., Chiang K.-S., Kates, J.R.** (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *C. reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.* **25**, 47-66
- Tarun, S.Z., Sachs, A.B.** (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168-7177
- Thain, S.C., Hall, A., Millar, A.J.** (2000). Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr. Biol.* **10**, 951-956
- Van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P. M., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers J. H. J., and Yasui, A.** (1999), Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**, 627-630
- Van Pilsum, J.F., Martin, R.P., Kito, E., Hess, J.** (1956). Determination of Creatin, Arginine, Guanidinoacetic, Guanidine and Methyl-Guanidine in Biological Fluids. *J. Biol. Chem.* **222**, 225-236
- Villand, P., Forssen, M., Karlsson, J. Samuelsson, G.** Low CO₂ induced gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*: molecular cloning of a gene possibly involved in a transduction pathway. **unveröffentlicht**
- Vitaterna, M.H., Joseph, D., Takahashi, S., Turek, F.W.** (2001). Overview over circadian rhythms. *Alcohol Research & Health* **25**, 85-93
- Waltenberger, H., Schneid, C., Grosch, J.O., Bareiss, A., Mittag, M.** (2001). Identifikation of target mRNAs for the clock controlled RNA-binding protein Chlamy 1 from *C. reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics* **265**, 180-188
- Watson, N.** (1988). A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene* **70**, 399-403

Wilkins, M.B. (1992). Tansley review No. 37. Circadian rhythms: their origin and control. *New Phytol.* **121**, 347-375

Wollnik, F. (1989). Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. *Laboratory Animals* 23, 107-125

Xiang, Y., Zhang, J., Weeks, D.P. (2001). The *Cia5* gene controls formation of the carbon concentrating mechanism in *C. reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5341-5346

Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119

Young, M.W., Kay, S.A. (2001). Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. *Nature* **2**, 702-715

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: Vereinfachtes Modell eines circadianen Systems	5
Abb. 2: Bindeaktivität von CHLAMY 1 in einem LD- und einem LL-Zyklus (nach Mittag, 1996).....	11
Abb. 3: Restriktionskarte des Plasmids pMM3.....	18
Abb. 4: Restriktionskarte des Plasmids pMM14.....	18
Abb. 5: Restriktionskarte des Plasmids pAB1	19
Abb. 6: Restriktionskarte des Plasmids pHK18S4.....	19
Abb. 7: Ortsspezifische <i>in vitro</i> -Mutagenese nach Deng & Nickoloff (1992)	49
Abb. 8: Endprodukt der „Sakaguchi-Reaktion“	65
Abb. 9: <i>In vitro</i> -Mutagenese der 22 Nukleotide langen Region im <i>lbp</i> 3'-UTR ..	67
Abb. 10: Überprüfung der mutierten Varianten von pMM3 durch Restriktionsverdau.....	69
Abb. 11: Autoradiogramme von „mobility shift“-Experimenten mit <i>C. reinhardtii</i> und <i>G. polyedra</i> Proteinrohextrakten zusammen mit dem <i>lbp</i> 3'-UTR- Transkript und seinen mutierten Versionen	71
Abb. 12: „Northern“-Analyse der Gesamt-RNS	73
Abb. 13: Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese von Aliquots aus der Erst- und Zweitstrangsynthese	74
Abb. 14: Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese von Aliquots aus der cDNS-Größenfraktionierung.....	75
Abb. 15: Restriktionsanalyse von zehn <i>in vivo</i> -exzisierten Plasmiden.....	77
Abb. 16: Hybridisierung zwischen Oligonukleotid-Sonde und cDNS der GAP-DH	78
Abb. 17: Sichtung der cDNS-Bank mittels PCR auf RNS-Transkripte mit der „UG“-Wiederholung im 3'-UTR	80
Abb. 18: Gelelektrophorese einer Kontroll-PCR zur Amplifikation von 3'-UTRs, die die „UG“-Wiederholung enthalten.....	81

Abb. 19: Gelelektrophorese nach der Amplifikation von 3'-UTRs mit dem Oligonukleotid UG3 und dem (T ₁₁)-Oligonukleotid mit seinen 12 unterschiedlichen Verankerungen.....	82
Abb. 20: Gelelektrophorese der klonierten PCR-Fragmente	83
Abb. 21: Sichtung der Amplifikate durch „Southern“-Hybridisierung mit einem Oligonukleotid gegen die „T(T)G“-Wiederholung.....	86
Abb. 22: Amplifikation der 3'-Enden und Klonierung in pBluescript KS+	92
Abb. 23: Restriktionsanalyse der Plasmide.....	94
Abb. 24: Spezifische Konkurrenz der ³² P-markierten Transkripte mit dem <i>lbp</i> _{wt} bzw. <i>lbp</i> (_{UG})-Transkript.....	98
Abb. 25: Charakterisierung der RNS-Bindeproteine im „UV-crosslinking“-Experiment	100
Abb. 26: Spezifische Konkurrenz des ³² P-markierten <i>gs2</i> -Transkripts mit verschiedenen unmarkierten Transkripten	103
Abb. 27: Quantitative Auswertung der Konkurrenzexperimente.....	105
Abb. 28: Reaktion der Argininosuccinat-Lyase (ASL).....	107
Abb. 29: Argininosuccinat-Lyase-Aktivität unter LD	109
Abb. 30: Argininosuccinat-Lyase-Aktivität unter LL.....	110
Abb. 31: PCR-Amplifikate für die Quantifizierung der <i>arg7</i> -mRNS und der <i>18S</i> -mRNS.....	113
Abb. 32: Überprüfung der RNS-Präparationen auf Kontamination durch gDNS	114
Abb. 33: Exponentielle Bereiche bei der Amplifikation von <i>arg7</i> und <i>18S</i>	115
Abb. 34: Semiquantitative RT-PCR von <i>arg7</i> unter LD.....	117
Abb. 35: Semiquantitative RT-PCR von <i>arg7</i> unter LL	118
Abb. 36: Amplifikation der <i>arg7</i> - und <i>rps18</i> -Sonden.....	120
Abb. 37: Kontrollverdau des Plasmids pHW44.....	121
Abb. 38: Kontrollverdau des Plasmids pHW43	122
Abb. 39: „Northern“-Hybridisierung mit der <i>rps18</i> -Sonde	123
Abb. 40: „Northern“-Hybridisierung mit der <i>arg7</i> -Sonde.....	124
Abb. 41: Das <i>arg7</i> -Gen im Plasmid pJD67	126
Abb. 42: <i>in vitro</i> -Mutagenese der „UG“-Repetition im <i>arg7</i> 3'-UTR.....	127

Abb. 43: Subklonierung eines pJD67 Fragments zur <i>in vitro</i> -Mutagenese	129
Abb. 44: Gelelektrophorese eines Kontrollverdau des Plasmids pHW33	130
Abb. 45: „mobility shift“-Experiment mit dem mutierten <i>arg7</i> 3'-UTR.....	130
Abb. 46: Deletion eines 31 Bp-Fragments 5' des mutierten Bereichs von <i>arg7</i> . 131	
Abb. 47: Deletion eines <i>EcoR1</i> / <i>DdeI</i> Fragments aus dem 3'-UTR des <i>arg7</i> _{mut} Gens.....	132
Abb. 48: Restriktionskarte des Plasmids pHW41	133
Abb. 49: „mobility shift“- und „UV-crosslink“ mit dem <i>arg7</i> (UG) 3'-UTR	134
Abb. 50: ASL-Aktivität der mit pJD67 (<i>arg7</i>) transformierten Zellen.....	136
Abb. 51: ASL-Aktivität der mit pHW41 (<i>arg7</i> -UG) transformierten Zellen	137
Abb. 52: Theoretische Sekundärstruktur des <i>lbp</i> 3'-UTR (aus Mittag <i>et al.</i> , 1994)	141
Abb. 53: Lokalisierung der Proteine, für die die „UG“-haltigen mRNS aus <i>C.</i> <i>reinhardtii</i> kodieren	148

Tabellen

Tab. 1: Eingeführte Restriktionsschnittstellen zur Überprüfung der mutierten Varianten von pMM3.....	68
Tab. 2: Phagentiter und Rekombinationsrate der cDNS-Bank	76
Tab. 3: Informationen aus den Sequenzen der amplifizierten PCR-Fragmente....	84
Tab. 4: Charakteristika der Genbereiche, die sich „upstream“ der 3'-UTRs befinden.....	87
Tab. 5: Vergleich des [T(T)G] ₇ -Oligonukleotids mit den [T(T)G]-Repetitionen der amplifizierten 3'-UTRs	88
Tab. 6: <i>C. reinhardtii</i> -RNS-Transkripte mit einer „UG“-Repetition im 3'-UTR, die sich aus mindestens sieben „UG“-Elementen zusammensetzt.....	89
Tab. 7: Restriktionsverdau zur Charakterisierung der Plasmide	93
Tab. 8: Linearisierung der Plasmide für die Transkription vom T3 bzw. T7 Promotor.....	95

Tab. 9: Molare Verhältnisse unmarkierter Kompetitor-RNS, die zu einer auf 50 % reduzierten Bindung zum ³² P-markierten gs2-Transkript führen, im Vergleich zur Anzahl der „U(U)G“-Elemente.....	106
Tab. 10: Neu identifizierte <i>C. reinhardtii</i> -mRNS mit einer „UG“-Repetition im 3'-UTR („GenBank“-Suche im Februar 2002).....	150

Lebenslauf

Name: Harald Waltenberger
Geburtsdatum: 16.12.1967
Geburtsort: Stolzenau Krs. Nienburg
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1974-1977 Katholische Grundschule Frankenforst, Berg.-Gladbach
1977-1987 Albertus Magnus Gymnasium, Berg.-Gladbach
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

1987-1989 Zivildienst bei der Johanniter Unfallhilfe in Berg.-Gladbach

Hochschulausbildung:

1989-1992 Grundstudium der Biologie (Diplom) an der Universität Köln

1992-1996 Hauptstudium der Biologie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Hauptfach: Pflanzenphysiologie

1995-1996 Diplomarbeit zum Thema: „Versuche zur Klonierung des Gens für die Progesteron-5 β -Reduktase aus *Digitalis purpurea*“ unter der Anleitung von Prof. Dr. H.U. Seitz am Lehrstuhl für allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen

1996 Anstellung in der Kardiologie der Med. Klinik II der Universität Tübingen bei Dr. Bernhard Brehm

Oktober 1996 Beginn der Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Wolfhart Rüdiger und nachfolgend PD Dr. Maria Mittag am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Thema: „Identifikation und Charakterisierung von Ziel-mRNS des circadianen RNS-Bindeproteins CHLAMY 1 aus *Chlamydomonas reinhardtii*“

seit Februar 2001 Anstellung bei der MicroCoat GmbH Bernried

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München am Lehrstuhl für Phytochemie (Prof. Dr. Dr. h. c. Wolfhart Rüdiger) unter der Leitung von PD Dr. Maria Mittag durchgeführt.

Herrn Prof Dr. Dr. W. Rüdiger danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können.

Vor allem Maria Mittag möchte ich danken, daß sie sich mit viel persönlichem Einsatz um den erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit bemüht hat. Sie hat mich sorgfältig in die molekularbiologischen Geheimnisse der circadianen Rhythmik eingeführt und zu dem Gelingen dieser Dissertation mit vielen nützlichen Tips entscheidend beigetragen. Vielen Dank weiter für die zahlreichen konstruktiven Anregungen und die vielen praktischen Hilfestellungen.

Mein herzlicher Dank gilt ferner:

- den restlichen Arbeitsgruppen dieses Lehrstuhls mit ihren Mitarbeitern, die oft mit Rat und Material hilfreich zur Seite standen. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle die Arbeitsgruppe Scheer, bei der ich jederzeit das Photometer blockieren konnte, und die Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann die mehrere Sequenzierungen für mich durchführte.
- den Sekretärinnen Rosi und Theresa für den unermüdlichen Einsatz im Bürokratiedschungel.
- Dr. Ulrike Oster, sie hat mich an ihrem reichhaltigen Wissen über den praktischen Laboralltag teilhaben lassen.
- Herrn H. Schießl, für die stete Bereitschaft notwendige Reparaturen noch bis gestern zu erledigen.
- der Kantine, für den phantasielosen Pampf, der die Mittagspause auf ein absolutes Minimum reduzierte.
- Ganz besonders möchte ich bei meinen Laborkollegen Claudia (sie wars, sie wars...) , Heidi, Jens, Susanne und Armin für das nette Laborklima und die tatkräftige Unterstützung bei mancher nicht allein zu bewältigender Aufgabe – und sei es nachts um 2:00 Uhr – bedanken.
- dem Isotopenlaborteam (Bernd, Stefan, Verena, ...), für die strahlende Zusammenarbeit und die erleuchtenden Gespräche...
- all meinen guten Freunden, die ich in den letzten Jahren etwas vernachlässigt habe, und die mir trotzdem die Treue gehalten haben.
- Elke, für ihre Geduld und Unterstützung, wenn es darauf ankam.

Vor allen aber möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die es ermöglicht haben, daß von einer halben Stelle ein ganzer Mann existieren konnte.